

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Artritis reumatoide y terapia de depleción de linfocitos B: relaciones entre la expresión de receptores del factor activador de linfocitos B y los patrones de recaída clínica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Becerra Fernández

Directores

Inmaculada de la Torre Ortega

Luis Carreño Pérez

Luis Collado Yurrita

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**ARTRITIS REUMATOIDE Y TERAPIA DE DEPLECIÓN DE
LINFOCITOS B: RELACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES DEL FACTOR ACTIVADOR DE LINFOCITOS B
Y LOS PATRONES DE RECAÍDA CLÍNICA**

Elena Becerra Fernández

Directores:

Inmaculada de la Torre Ortega

Luis Carreño Pérez

Luis Collado Yurrita

Madrid, Octubre 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

**ARTRITIS REUMATOIDE Y TERAPIA DE DEPLECIÓN DE
LINFOCITOS B: RELACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES DEL FACTOR ACTIVADOR DE LINFOCITOS B
Y LOS PATRONES DE RECAÍDA CLÍNICA.**

Elena Becerra Fernández

Directores:

Inmaculada de la Torre Ortega

Luis Carreño Pérez

Luis Collado Yurrita

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Inmaculada de la Torre Ortega por introducirme en el mundo de la investigación y acompañarme en sus inicios, por dirigir esta tesis doctoral y ayudarme durante su realización.

Al Dr. Luis Carreño por sus enseñanzas durante toda mi residencia, por animarme a empezar este trabajo de investigación y codirigir mi tesis doctoral.

Al Dr. Luis Collado, por su disposición y ayuda para la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier López-Longo, por sus sabios consejos e inestimable colaboración, tanto durante la residencia como posteriormente.

A la Dra. María Leandro, y muy especialmente a la Dra. Jo Cambridge, de University College London, por todas sus enseñanzas, esfuerzo y dedicación en el laboratorio, y posterior colaboración en la realización de la tesis doctoral. Gran parte de esta tesis se la debo a ellas.

A los organismos que financiaron mi estancia en University College London entre los años 2010-2012, inicialmente la “Beca Post-MIR 2010” de la Fundación para la Investigación Biomedica del Hospital Gregorio Marañón, y seguidamente la “Beca de investigación en universidades o centros en el extranjero 2011-2012” de la Fundación Alfonso Martín Escudero.

A mis padres, por su apoyo incondicional durante todas las etapas de mi formación académica y profesional; por haberme dado la oportunidad de aprender idiomas, hacer estancias en el extranjero y empezar a sentir curiosidad por el mundo. A ellos les debo mi impulso y ganas de iniciar nuevos proyectos. A mi hermana, por sus ánimos y sabios consejos, que tanto ayudan a ordenar mis ideas. A los tres les debo gran parte de esta tesis.

A Ángel, por creer siempre en mí, por su contagioso optimismo, su paciencia infinita y su tranquilidad. Por ayudarme tanto a diario y en especial en las etapas finales de la tesis. También le debo gran parte de esta tesis.

A mis resis, por haberme apoyado y acompañado en todas mis etapas profesionales, por estar siempre disponibles y seguir cuidando nuestra amistad. A mis amigos de toda la vida y a mis amigos médicos, por estar siempre ahí, tanto a nivel personal como profesional. Y por supuesto, a toda mi familia, que siempre me ha animado con mis nuevos proyectos, ofreciendo su ayuda de forma incondicional.

Artritis Reumatoide y terapia de depleción de linfocitos B: relaciones entre la expresión de receptores del factor activador de linfocitos B y los patrones de recaída clínica..... 4

Tesis doctoral íntegra en español

Rheumatoid Arthritis and B cell depletion therapy: relationships between expression of B-cell activating factor binding receptors and patterns of clinical relapse..... 168

Tesis doctoral íntegra en inglés

**ARTRITIS REUMATOIDE Y TERAPIA DE DEPLECIÓN
DE LINFOCITOS B: RELACIONES ENTRE LA
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DEL FACTOR
ACTIVADOR DE LINFOCITOS B Y LOS PATRONES DE
RECAÍDA CLÍNICA**

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	14
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	24
Artritis Reumatoide	24
Subpoblaciones de células B.....	28
Terapia de depleción de células B con anticuerpos monoclonales anti-CD20 (Rituximab®)	35
Célula B, Rituximab y artritis reumatoide	37
Estudios de células B en AR.....	38
Experiencia de los pacientes tratados con RTX en UCL.....	43
Opciones de retratamiento con RTX en AR	45
Rituximab en otras enfermedades autoinmunes	46
Rituximab en púrpura trombótica trombocitopénica	49
Factor activador de la célula B (BAFF) y receptores de BAFF	51
Factor activador de la célula B / B-cell activating factor (BAFF).....	51
Niveles de BAFF después de la depleción de células B.....	57
Receptor del factor activador de la célula B (BAFF-R o BR3).....	59
Transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI).....	61
B-cell maturation antigen (BCMA)	64
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	65
HIPÓTESIS:.....	67

OBJETIVOS:	68
MATERIAL Y MÉTODOS	69
Diseño	69
Población	69
Criterios de exclusión	73
Variables recogidas	74
Técnicas	76
Evaluación de la depleción de células B	76
Aislamiento y tinción de células mononucleares en sangre periférica	77
Citometría de flujo	78
Preparación de las muestras	79
Citómetro de flujo	87
Análisis de datos	87
Medición de BAFF	87
Estadística	88
RESULTADOS	89
Patrones de recaída en la cohorte de pacientes con AR de UCL tratada con RTX	89
Expresión de BBRs en subpoblaciones de células B en pacientes con AR en recaída tras depleción terapéutica de linfocitos B	93
1. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes en recaída clínica después de RTX	96
2. ¿Hay alguna correlación entre las subpoblaciones de células B y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica en pacientes post-RTX?	99
3. Expresión de los receptores de BAFF en pacientes con AR pre-RTX y post-RTX en recaída	101

5. ¿Hay alguna correlación entre la expresión de los BBRs y el tiempo entre la repoblación de células B y la recaída clínica en pacientes con AR tratados con terapia de depleción de linfocitos B?	112
5. Niveles de BAFF	114
6. ¿Hay correlación entre los niveles de BAFF sérico y la expresión de BBRs?	115
Expresión de BAFF-R en subpoblaciones de células B en pacientes con PTT tras depleción terapéutica de linfocitos B.....	117
1. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación tras rituximab.....	119
2. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con PTT en remisión tras la repoblación.....	120
3. ¿Hay alguna correlación entre las subpoblaciones de células B y el tiempo desde la administración de RTX?	122
4. Expresión de BAFF-R en el momento de la repoblación.....	123
5. Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT después de la repoblación	126
6. ¿Hay alguna correlación entre la expresión de BAFF-R y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX?	128
7. Niveles de BAFF	129
8. ¿Hay correlación entre los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R?	131
DISCUSIÓN	132
Patrones de recaída en la cohorte de pacientes con AR de UCL tratada con RTX	132
Subpoblaciones de células B en pacientes con AR y PTT después de RTX.....	135
Expresión de BAFF-R.....	138
Expresión de BCMA.....	140
Expresión de TACI.....	141
Estudios de BBRs en enfermedades autoinmunes.....	142

Niveles de BAFF.....	145
Correlación entre la expresión de BAFF-R y los niveles de BAFF	145
Correlación entre la expresión de BAFF-R y el tiempo transcurrido desde la repoblación o inicio de RTX.....	148
Limitaciones del estudio.....	149
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	154
ANEXO: PUBLICACIONES.....	322

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios de clasificación de la artritis reumatoide de la ACR (1987)	25
Tabla 2: Criterios de clasificación de la artritis reumatoide EULAR/ACR (2010).....	26
Tabla 3: Datos demográficos de la cohorte de pacientes con AR de UCL y tratamientos recibidos	90
Tabla 4: Características de los pacientes con AR pre-RTX	94
Tabla 5: Características de los pacientes con AR en recaída clínica después de RTX ..	95
Tabla 6: Características demográficas y datos de laboratorio en pacientes con PTT...	118
Tabla 7: Características demográficas y datos de laboratorio de los pacientes con AR incluidos en el estudio comparativo con PTT	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciación y activación de la célula B.....	29
Figura 2: Fases del desarrollo de la célula B y marcadores de superficie característicos de cada subpoblación celular.....	30
Figura 3: Subpoblaciones de linfocitos B en base a los marcadores IgD/CD27.....	31
Figura 4: Subpoblaciones de linfocitos B en base a los marcadores IgD/CD38, en combinación con el marcador CD27 de célula memoria.....	32
Figura 5: Equivalencia entre los subtipos de células B memoria.....	33
Figura 6: Linfocitos B CD20+.....	36
Figura 7: Estudio citométrico de un paciente con depleción de células B CD19+ a los 6 meses de tratamiento con RTX.....	39
Figura 8: Estudio citométrico pre y post-RTX utilizando los marcadores IgD/CD27 e IgD/CD38.....	40
Figura 9: Ligandos y receptores de BAFF y APRIL.....	53
Figura 10: Diferenciación y activación de la célula B y expresión de BBRs.....	54
Figura 11: Esquema explicativo de la organización de la consulta de UCL.....	77
Figura 12: Selección de los distintos tipos celulares mediante forward (FSC-H) y side scatter (SSC-H).....	79
Figura 13: Selección inicial de la población de linfocitos, y seguidamente de la población de células B CD19+.....	80
Figura 14: Subpoblaciones de células B según la expresión de IgD/CD38.....	81
Figura 15: Subpoblaciones de células B según la expresión de IgD/CD27.....	82
Figura 16: Estudio citométrico de BAFF-R en células CD19+.....	84

Figura 17: Estudio citométrico de TACI en células CD19+.	85
Figura 18: Estudio citométrico de BCMA en células CD19+.	86
Figura 19: Pacientes con R-C y R-D.	92
Figura 20: Ejemplo de un estudio citométrico de los subtipos de células B.	96
Figura 21: Porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B definidas en base a la expresión de IgD/CD38 en pacientes pre y post-RTX.	98
Figura 22: Valores absolutos de las subpoblaciones de linfocitos B definidas en base a la expresión de IgD/CD38 en pacientes pre y post-RTX en recaída clínica.	99
Figura 23: Correlación entre el porcentaje de subpoblaciones de células B y el tiempo entre la repoblación y la recaída clínica.	100
Figura 24: Porcentaje de células B BAFF-R+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.	103
Figura 25: MFI de BAFF-R en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.	105
Figura 26: Estudio citométrico de la expresión de BAFF-R en un paciente pre y post-RTX.	106
Figura 27: Porcentaje de células B TACI+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.	107
Figura 28: MFI de TACI en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica. .	108
Figura 29: Estudio citométrico de la expresión de TACI en un paciente pre y post-RTX.	109
Figura 30: Porcentaje de células B BCMA+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.	110
Figura 31: MFI de BCMA en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.	111
Figura 32: Estudio citométrico de la expresión de BCMA en un paciente pre y post-RTX.	111

Figura 33: Correlación entre el porcentaje de células BAFF-R+ y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica.....	112
Figura 34: Correlación entre la MFI de BAFF-R y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica.....	113
Figura 35: Niveles de BAFF sérico en CS, pacientes pre-RTX, y pacientes post-RTX.	114
Figura 36: Correlación entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células B BAFF-R+ en pacientes con AR.	115
Figura 37: Correlación entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células B BAFF-R+ en pacientes post-RTX.	116
Figura 38: Ejemplos de análisis citométrico de un paciente con PTT y otro con AR, según la clasificación IgD/CD27.....	119
Figura 39: Comparación de las subpoblaciones de células B en pacientes con AR y PTT en el momento de la repoblación.....	120
Figura 40: Evolución de las subpoblaciones de células B en pacientes con PTT antes y después de RTX.....	121
Figura 41: Relación entre el porcentaje de cada subtipo de célula B y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX.....	123
Figura 42: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación.....	124
Figura 43: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación.....	125
Figura 44: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT antes y después de RTX.	128
Figura 45: Relaciones entre la expresión de BAFF-R y el tiempo desde el tratamiento con RTX.	129
Figura 46: Niveles de BAFF sérico en CS, y pacientes con PTT antes y después de RTX.....	130
Figura 47: Relación entre los niveles de BAFF y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX en pacientes con PTT en remisión.....	130

Figura 48: Correlación entre los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R en pacientes con PTT en remisión tras RTX.....	131
--	-----

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACR: American College of Rheumatology (Colegio Americano de Reumatología)

AR: Artritis reumatoide

Ac: Anticuerpo

Ac anti-PCC: Ac antipéptido citrulinado cíclico

Ag: Antígeno

ANCA: Antineutrophil cytoplasmic antibody: Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo

BAFF / BLyS: B-cell activating factor / B-lymphocyte stimulator: Factor activador de la célula B /Factor estimulante del linfocito B

BAFFR-R / BR3: B-cell activating factor receptor: receptor de BAFF

BCMA: B cell maturation antigen: antígeno de maduración de linfocito B

BCR: B-cell receptor: receptor del linfocito B

CDR: complementary determinant region: región determinante complementaria

CD40L: ligando CD40

CG: centro germinal

CS: controles sanos

CSR: class *switch* recombination: cambio de clase de Inmunoglobulina

CVID: common variable immunodeficiency: inmunodeficiencia común variable

CYC: Ciclofosfamida

DAS: Disease activity score: puntuación de actividad de la enfermedad

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EULAR: European League Against Rheumatism: Liga Europea contra el Reumatismo

FAME: fármaco modificador de la enfermedad

FACS: fluorescence activated cell-sorter: células activadas por fluorescencia

FITC: fluorescein isothiocyanate: isotiocianato de fluoresceína

HACAs: human anti-chimaeric antibodies: Anticuerpos anti-quiméricos humanos

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

LES: lupus eritematoso sistémico

MM: mieloma múltiple

MO: médula ósea

MFI: mean fluorescence intensity: intensidad media de fluorescencia

MTX: metotrexato

MZ: marginal zone

PBMC: peripheral blood mononuclear cells: células mononucleares en sangre periférica

PCR: proteína C reactiva

PE: phycoerythrin: ficoeritrina

PerCP-Cy5.5: peridinin chlorophyll protein cyanin: proteína clorofila-peridininina de cianina

PTT: púrpura trombótica trombocitopénica

R-C: recaída concordante

R-D: recaída discordante

RTX: Rituximab

SER: Sociedad Española de Reumatología

SHM: somatic hypermutation: hipermutación somática

SS: síndrome de Sjögren

TACI: transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor: activador transmembrana e interactor de ligando ciclofílico modulador de la señal de calcio

TLR: Toll-like receptor: receptores de tipo Toll

TNF: tumor necrosis factor: factor de necrosis tumoral

UCL: University College London

VSG: velocidad de sedimentación globular

RESUMEN

Introducción

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica inflamatoria crónica con afectación articular y extra-articular. Es la artropatía inflamatoria más frecuente, afectando al 0,5-1 % de la población general. La AR y otras patologías autoinmunes se caracterizan por la producción de autoanticuerpos. El manejo de la AR se basa en el uso de fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) convencionales y biológicos, entre estos, el anticuerpo (Ac) monoclonal quimérico murino-humano anti-CD20 Rituximab® (RTX), que también se utiliza para el tratamiento de otras patologías autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT).

La terapia de depleción de linfocitos B con RTX comenzó a utilizarse en University College London (UCL) en 1998; en base a los primeros resultados, describieron dos patrones de recaída: coincidente con la repoblación de células B o recaída concordante (R-C) o meses después de la repoblación periférica de células B, o recaída discordante (D-R).

El factor activador de la célula B (BAFF) tiene un papel esencial en la maduración, homeostasis y supervivencia del linfocito B. BAFF puede unirse a tres receptores: el receptor de BAFF (BAFF-R), *transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor* (TACI) y *B-cell maturation antigen* (BCMA). Los tres receptores se expresan de forma diferente durante el desarrollo de la

célula B. Los niveles de BAFF aumentan durante la depleción periférica de células B ocurrida tras el tratamiento con RTX, y descienden paulatinamente tras la repoblación periférica. El estudio previo de pacientes con AR en recaída clínica tras RTX evidenció una expresión reducida de BAFF-R en células B *naïve* y memoria, especialmente en los pacientes con R-C.

La tesis doctoral plantea inicialmente una revisión de la cohorte de pacientes con AR tratados con RTX en UCL, para calcular la frecuencia de pacientes con R-C y R-D. Seguidamente se plantea un estudio de BAFF y sus receptores (BAFF-R, TACI y BCMA) en AR, buscando posibles diferencias entre los patrones de recaída. Posteriormente se ha hecho un estudio comparativo con pacientes con PTT, patología directamente asociada a la producción de autoanticuerpos. Al contrario que en AR, los pacientes con PTT tratados con RTX suelen permanecer en remisión tras un único ciclo de tratamiento, lo que permite estudiar la evolución de las subpoblaciones de células B y el sistema BAFF/BAFF-R años después de haber recibido un único ciclo de RTX.

Hipótesis

Los dos patrones de recaída clínica observados en AR tras la repoblación periférica de linfocitos B posterior a la terapia de depleción de linfocitos B por RTX podrían explicarse por diferencias en la expresión de los receptores de BAFF.

Objetivos

Principal:

- Analizar las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de los receptores de BAFF en controles sanos y pacientes con AR divididos en tres grupos: pre-RTX, recaída concordante y recaída discordante.

Secundarios:

- Estudio retrospectivo observacional de la cohorte de pacientes con AR en tratamiento con RTX en UCL, analizando el patrón de recaída tras la repoblación periférica de células B después de un ciclo de RTX.
- Estudio comparativo entre pacientes con AR y pacientes con PTT, analizando las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R.

Material y métodos

- Análisis de la cohorte de pacientes con AR tratada con RTX en UCL entre los años 1998-2012, con recogida de variables demográficas, analíticas, tratamientos previos y concomitantes, determinación de linfocitos CD19+ por citometría de flujo, y tiempo entre el tratamiento y la repoblación periférica de células B, y entre ésta y la recaída clínica.
- Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de los receptores de BAFF (BAFF-R, TACI y BCMA) en pacientes con AR

tratados con RTX. Para ello se seleccionaron un total de 37 pacientes con AR, y se dividieron en 3 grupos: pacientes con AR antes del primer ciclo de RTX, y pacientes en recaída clínica tras haber recibido RTX, divididos según el patrón de recaída en R-C y R-D. Se realizaron estudios de citometría de flujo para la determinación de los subtipos de célula B, en base a la clasificación IgD/CD38, y se calculó la expresión de los receptores de BAFF en cada subtipo de célula B. Los niveles de BAFF se calcularon mediante un ELISA.

- Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión BAFF-R en pacientes con PTT y en pacientes con AR. Se obtuvieron muestras de 19 pacientes diagnosticados con PTT, y se seleccionaron 6 pacientes con AR para su estudio comparativo. Se realizaron estudios de citometría de flujo para la determinación de los subtipos de célula B, en base a la clasificación IgD/CD27, y se calculó la expresión de BAFF-R en cada subtipo de célula B. Los niveles de BAFF se calcularon mediante un ELISA.

Resultados

271 pacientes recibieron RTX en el servicio de Reumatología de UCL entre los años 1998 y 2012, esto es, un total de 886 pacientes-año de seguimiento. Se administraron un total de 910 ciclos de tratamiento. Se seleccionaron 168 pacientes con buena respuesta a su primer ciclo de RTX, y que continuaron seguimiento al menos hasta la primera recaída, que se produjo entre 4 y 45 meses después del primer ciclo. Se identificó una R-C en 118 pacientes (70%), con un tiempo medio hasta la repoblación de 7,1 meses (rango 3-20 meses) y un tiempo medio hasta la recaída de 7,7 meses

(rango 4-20 meses), y una R-D en 50 pacientes (30 %), con un tiempo medio hasta la repoblación de 7,8 meses (rango 3-20 meses) y un tiempo medio hasta la recaída de 17,4 meses (rango 6-67 meses).

El estudio fenotípico y de BBRs en pacientes analizados antes de RTX y en el momento de la recaída clínica (R-C o R-D) tras la repoblación periférica de linfocitos B mostró un mayor porcentaje de células B transicionales en los pacientes con R-C, mientras que los pacientes con R-D tenían mayor porcentaje de células B *naïve* maduras. El porcentaje de células B que expresaban BAFF-R+ se redujo significativamente en todos los pacientes después del tratamiento con RTX, con mayor reducción en los pacientes con R-C. El análisis de TACI mostró una reducción del porcentaje de células memoria TACI+ en pacientes post-RTX. El análisis de BCMA no obtuvo resultados relevantes. Se vio una correlación directa entre el porcentaje de células BAFF-R+ y el tiempo entre la repoblación de células B y la recaída clínica, en células *naïve* (ambos subtipos) y células post-centro germinal. Se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células BAFF-R+ en todos los subtipos celulares excepto los plasmoblastos.

En cuanto al estudio comparativo de pacientes con AR y PTT en el momento de la repoblación periférica de células B después del tratamiento con RTX, se vio que la repoblación se iniciaba con un porcentaje elevado de células B *naïve* en ambos casos. En los pacientes con PTT en remisión entre 10 y 68 meses después de RTX la mayoría de linfocitos B identificados siguen siendo *naïve*, con una recuperación parcial del porcentaje de células B memoria, dependiente del tiempo transcurrido desde el tratamiento. En el momento de la repoblación periférica de linfocitos B, la expresión de

BAFF-R estaba reducida tanto en pacientes con AR como con PTT. La expresión de BAFF-R había aumentado en los pacientes con PTT en remisión, objetivándose un aumento gradual de su expresión en relación con el tiempo transcurrido desde el tratamiento. Se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células BAFF-R+ en todos los subtipos celulares.

Conclusiones

Hay dos patrones claros de recaída en AR tras la repoblación de células B en sangre periférica en pacientes tratados con RTX, con un 70 % de pacientes con R-C frente a un 30 % de pacientes con R-D en este estudio. La monitorización de la depleción y repoblación de células B mediante citometría de flujo de alta resolución es útil para identificar la duración de la respuesta del paciente a un ciclo de tratamiento, y puede estandarizarse en la práctica clínica habitual.

La repoblación de células B tras RTX en pacientes con AR y PTT sigue un patrón similar al proceso de ontogenia, con una mayor frecuencia de células B *naïve*, y una regeneración reducida de células memoria. RTX produce cambios a largo plazo en el fenotipo de células B, con persistencia de un alto porcentaje de células B *naïve*, y un porcentaje reducido de células B memoria años después del tratamiento, como se ve en pacientes con PTT en remisión prolongada tras un único ciclo de RTX.

La expresión de BAFFR es menor en el momento de la repoblación después de la depleción de células B, y tiende a aumentar con el tiempo transcurrido desde la repoblación. El mecanismo de recaída de la enfermedad en pacientes con R-C parece

independiente del sistema BAFF/BBR, pero en los pacientes con R-D la expresión de BAFF-R aumenta paulatinamente, por lo que su mecanismo de recaída seguiría una vía más “normal”, con un desarrollo y maduración de la célula B dependiente de estos BBRs. La implicación de TACI y BCMA no queda clara con los resultados obtenidos en este estudio. En conclusión, aunque han podido identificarse diferencias en la expresión de BBRs en pacientes con R-C y R-D, la monitorización de los niveles de BAFF y la expresión de BBRs no parece aportar datos adicionales que ayuden a predecir el tipo de recaída del paciente con AR tratado con RTX, por lo que no puede sugerirse su realización en la práctica clínica habitual.

Palabras clave: artritis reumatoide, célula B, rituximab, factor activador del linfocito B (BAFF), receptor del factor activador del linfocito B (BAFF-R), púrpura trombótica trombocitopénica.

INTRODUCCIÓN

Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica inflamatoria crónica con afectación articular y extra-articular. Suele presentarse como dolor e inflamación simétrica, sobre todo en las pequeñas articulaciones de las manos, y acompañado habitualmente de rigidez y astenia. La afectación extra-articular incluye síntomas pulmonares, cardíacos, oculares o cutáneos, además del desarrollo de nódulos reumatoides o incluso de una vasculitis sistémica.

Es la artropatía inflamatoria más frecuente, afectando al 0,5-1 % de la población general. Es más frecuente en mujeres, con una proporción de 3:1 [1]. La mayor incidencia se presenta entre los 40-60 años, pero puede iniciarse a cualquier edad.

El Colegio Americano de Reumatología (American College of Rheumatology (ACR) publicó inicialmente los criterios diagnósticos de la enfermedad en 1987, incluyendo: rigidez matutina, artritis de 3 o más articulaciones, artritis en las articulaciones de la mano, artritis simétrica, nódulos reumatoides, factor reumatoide (FR) en suero, y cambios radiológicos (erosiones). Se considera AR probable cuando están presentes 4 ó más criterios de los 7 durante al menos 6 semanas [2].

Tabla 1: Criterios de clasificación de la artritis reumatoide de la ACR (1987)

1.- Rigidez matutina	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora
2.- Artritis de 3 o más grupos articulares	Al menos 3 grupos articulares deben estar inflamados simultáneamente y ser objetivados por un médico. Los 14 grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas
3.- Artritis de articulaciones de las manos	Al menos una articulación de las manos debe estar inflamada (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales)
4.- Artritis simétrica	Afectación simultánea del mismo grupo articular (definido en el criterio 2) en ambos lados del cuerpo
5.- Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxta-articulares observados por un médico
6.- Factor reumatoide en suero	Presencia de valores elevados de factor reumatoide por cualquier método con un resultado en controles inferior al 5%
7.- Alteraciones radiológicas	Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en articulaciones afectadas

Extraído de: “Actualización de la guía de práctica clínica para el manejo de la artritis reumatoide (GUIPCAR) en España”; Sociedad Española de Reumatología; 2011 (www.ser.es)

Los criterios diagnósticos se han redefinido recientemente en una publicación conjunta de la ACR y EULAR (European League Against Rheumatism: Liga Europea contra el Reumatismo). Clasifican la enfermedad como "AR definida" si se presenta sinovitis en al menos una articulación en ausencia de un diagnóstico que lo justifique y una puntuación de 6 (de un total de 10) en cuatro dominios: número y lugar de afectación articular (0-5); anormalidades serológicas (0-3), incluyendo el FR y/o los Anticuerpos (Ac) antipéptido citrulinado cíclico (Ac anti-PCC); elevación de reactantes de fase aguda: velocidad de sedimentación globular (VSG) o proteína C reactiva (PCR) (0-1); duración de la sintomatología (0-1) [3].

Tabla 2: Criterios de clasificación de la artritis reumatoide EULAR/ACR (2010)

Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global. Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6	
<i>Afectación articular</i>	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
<i>Serología</i>	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
<i>Duración</i>	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1
ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VN: valor normal; VSG: velocidad de sedimentación globular.	

Extraído de: “Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide”; Gomez, A. Reumatol Clin.2011;6 Supl 3:33-7 - Vol. 6 [4].

La artritis activa no controlada provoca daño articular, discapacidad progresiva y disminución de la calidad de vida. El esquema de tratamiento actual se basa en la estrategia “treat-to-target”, que persigue alcanzar la remisión o una baja actividad de la enfermedad [5]. El manejo de la AR se basa en el uso de los fármacos modificadores de la enfermedad (FAME), que reducen la sinovitis, la actividad inflamatoria sistémica y la progresión del daño articular. Los FAME convencionales incluyen agentes clásicos como el metotrexato (MTX), la sulfasalazina o la leflunomida. Los FAME biológicos incluyen los fármacos anti-factor de necrosis tumoral (TNF), el anti-CD20 Rituximab® (RTX), el inhibidor de la coestimulación del linfocito T Abatacept y el Ac monoclonal que bloquea el receptor de Interleuquina-6 (IL-6) Tocilizumab [6].

Las enfermedades autoinmunes, incluyendo la AR, se caracterizan por la producción de autoanticuerpos. Estos pueden aparecer en el suero de los pacientes con AR muchos años antes del comienzo de la enfermedad, lo que sugiere una alteración precoz en la tolerancia del linfocito B [7]. Los linfocitos B normales producen Ac contra antígenos (Ag) exógenos, pero durante la respuesta inmunológica, una mutación al azar en las inmunoglobulinas (Ig) puede cambiar la conformación del sitio de unión al Ag. Si el sitio de unión al Ag interacciona con un Ag endógeno y genera señales positivas para la supervivencia del linfocito B, éste puede sobrevivir y proliferar como un linfocito B autorreactivo, produciendo Ac frente a Ag endógenos, conocidos como autoanticuerpos [8].

Los linfocitos B en desarrollo deben pasar por dos filtros de control. El primero ocurre en la médula ósea (MO), entre las fases de linfocito B inmaduro precoz e inmaduro. Las células B autorreactivas mueren por apoptosis mediante un mecanismo conocido como delección clonal, o pierden autorreactividad mediante un mecanismo de edición del receptor. Si la señal del receptor de la célula B es muy intensa la célula suele morir en la MO [9]. El segundo filtro de control se encuentra en el bazo y la circulación periférica, donde las células B transicionales se diferencian hasta convertirse en células maduras foliculares o de la zona marginal; normalmente los clones reactivos con menos afinidad se vuelven anérgicos y se pierden en ese punto, impidiendo su conversión en linfocitos B *naïve* maduros de vida larga [10].

En los pacientes con AR hay alteraciones en los mecanismos de control de tolerancia central y periférica, permitiendo la acumulación de células *naïve* maduras

periféricas autorreactivas, que reconocen autoantígenos con baja afinidad, y pueden formar autoanticuerpos [11].

Subpoblaciones de células B

En humanos, todas las células B se originan de precursores comunes en la MO. Dependiendo de su estado de maduración, activación y diferenciación, los linfocitos B pueden localizarse en la MO, sangre periférica y tejidos linfoides secundarios. Se distinguen en base a la expresión de varios marcadores de superficie: marcadores de diferenciación (CD: clusters of differentiation) e isotipos de Ig de superficie. La Ig de superficie se asocia a otras moléculas, principalmente CD19 y CD21, formando el receptor del linfocito B (BCR: B-cell antigen receptor).

El desarrollo del linfocito B se produce en dos fases: una primera fase en MO, que es independiente del Ag, y una segunda fase en tejidos linfoides secundarios, que es dependiente del Ag. Los precursores del linfocito B (células pro-B y pre-B) están en la MO y, después del proceso de selección ya descrito, continúan su maduración hacia células transicionales, *naïve* maduras, memoria y plasmoblastos en sangre periférica. Los plasmoblastos son células secretoras de Ac recientemente diferenciadas, habitualmente de vida media corta, pero pueden recircular y alojarse en tejidos linfoides secundarios o MO, donde pueden diferenciarse en células plasmáticas maduras, que no suelen estar presentes en sangre periférica [12].

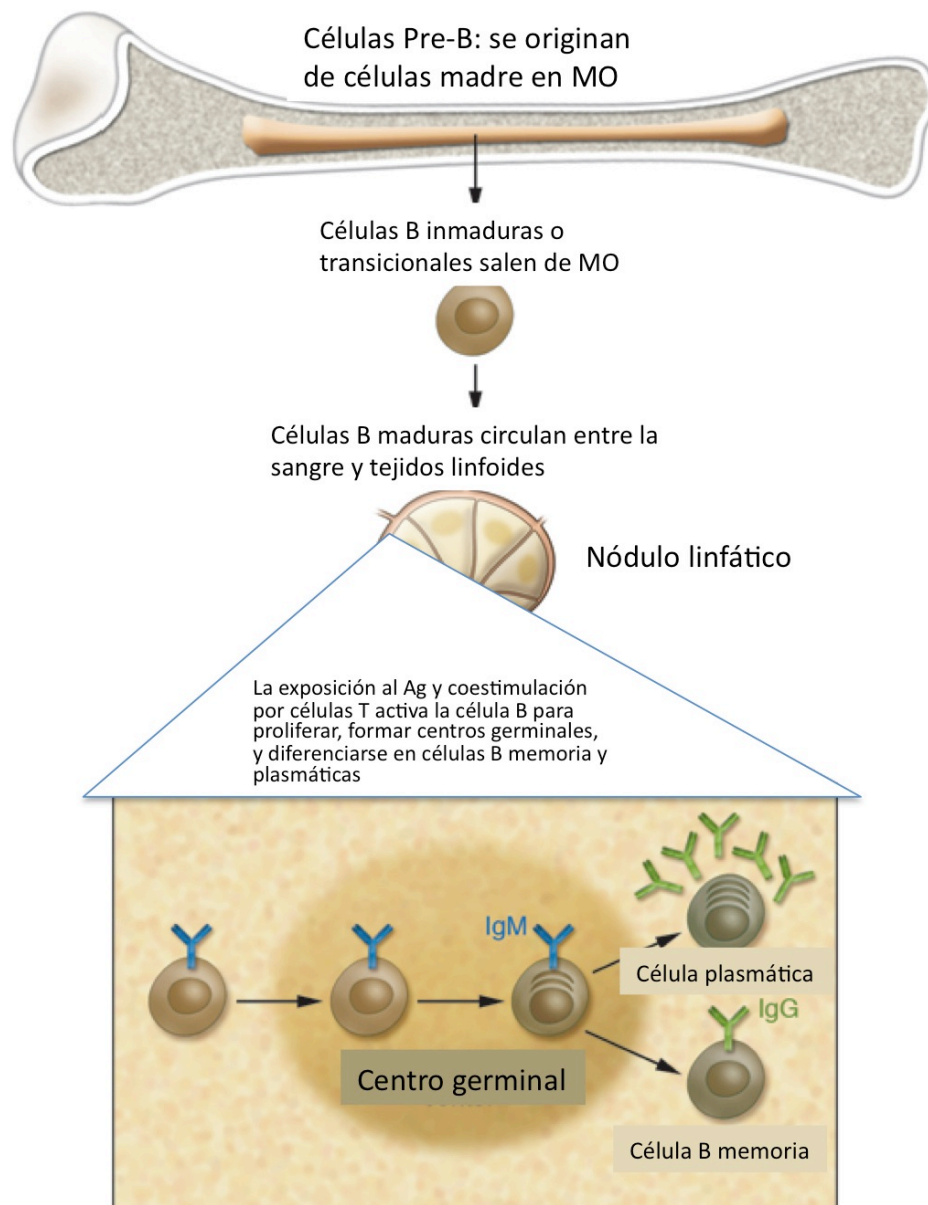


Figura 1: Diferenciación y activación de la célula B.

La célula B se origina en la MO, donde completa sus primeras fases de diferenciación y maduración. Las células B inmaduras abandonan la MO como células transicionales, y completan su maduración en los tejidos linfoides. Si se exponen a un Ag y reciben ayuda de la célula T pueden proliferar y formar centros germinales, diferenciándose en células B memoria y plasmáticas. *Modificado para AR de Cancro et al "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".*

El siguiente esquema muestra en más detalle el desarrollo de la célula B y los marcadores de superficie característicos de cada subpoblación celular.

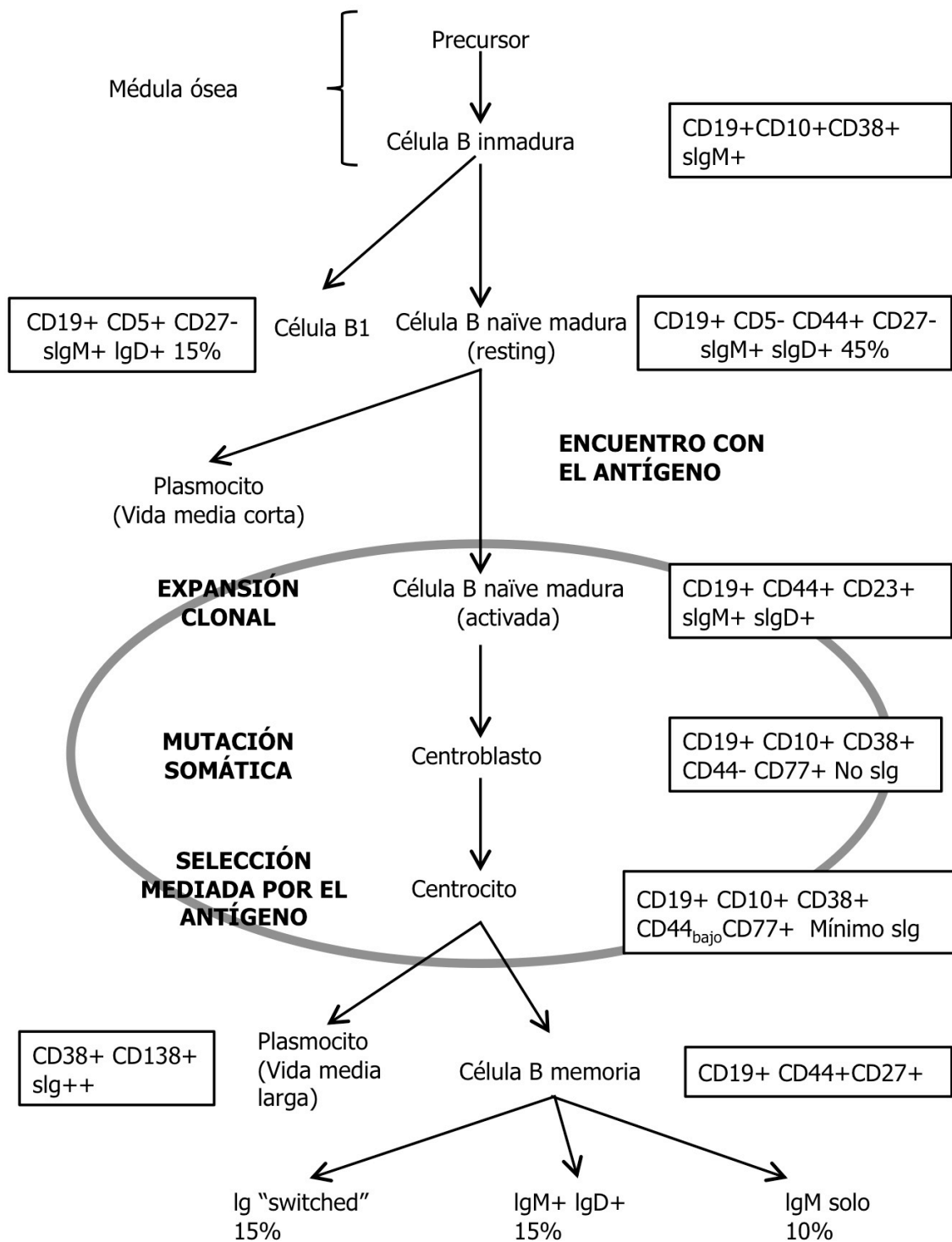


Figura 2: Fases del desarrollo de la célula B y marcadores de superficie característicos de cada subpoblación celular.

Los linfocitos B memoria se caracterizan tradicionalmente por el marcador CD27+, incluyendo las células B IgM+IgD+ B, las células IgM-, y las IgM-IgD- (células B memoria tras el cambio de isotipo o “switched”) [13]. Sin embargo, se ha descrito posteriormente un subtipo de linfocitos B memoria CD27- que expresa un receptor mutado, distinto de las células B *naïve* CD27- tradicionales [14]. La siguiente figura muestra un ejemplo de estudio citométrico utilizando los marcadores IgD/CD27.

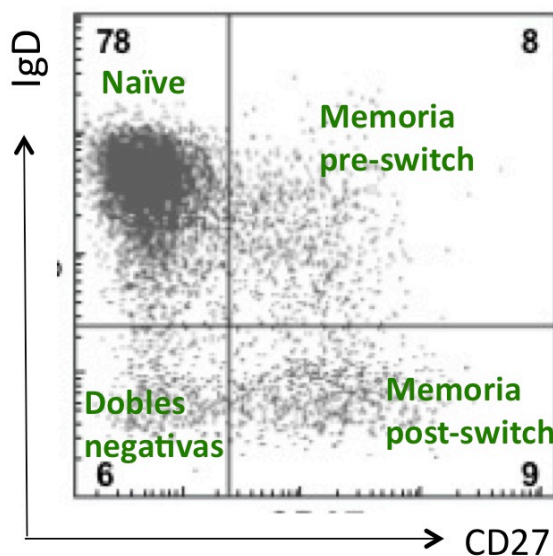


Figura 3: Subpoblaciones de linfocitos B en base a los marcadores IgD/CD27.

Los subtipos celulares descritos son: células B *naïve* (IgD+CD27-), memoria pre-switch (IgD+CD27+), memoria post-switched (IgD-CD27+) y células B memoria dobles negativas (IgD-CD27-). Modificado de Berkowska et al, “Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways”.

Berkowska et al describieron tres mecanismos de maduración distintos del linfocito B memoria, dependientes e independientes de los centros germinales (CG). Las células B CD27-IgG+ and CD27+IgM+ B derivan de reacciones primarias en los CG, y las células B CD27+IgA+ y CD27+IgG+ derivan de respuestas consecutivas en CG (1ª vía); las células B memoria naturales efectoras y las CD27-IgA+ tienen una proliferación limitada, reflejando un origen independiente del GC; las células naturales

efectoras se originan en parte en la zona marginal del bazo (2ª vía); las células CD27-IgA⁺ comparten características con las células IgA⁺ de la lámina propia intestinal, sugiriendo también un origen común de respuestas locales independientes del CG (3ª vía) [15].

Bohnhorst et al estudiaron las subpoblaciones de células B en sangre periférica mediante la clasificación IgD/CD38, en combinación con el marcador de célula B memoria CD27 [16]. De esta forma, pudieron esclarecer qué células dentro de la clasificación IgD/CD38 eran linfocitos B memoria. Además de las células memoria post-centro germinal (Post-CG: IgD-CD38⁺), definieron dos subtipos de células B memoria CD38⁻, dependiendo de si eran IgD⁺ (IgD⁺ *resting memory*) o IgD⁻ (IgD⁻ *resting memory*).

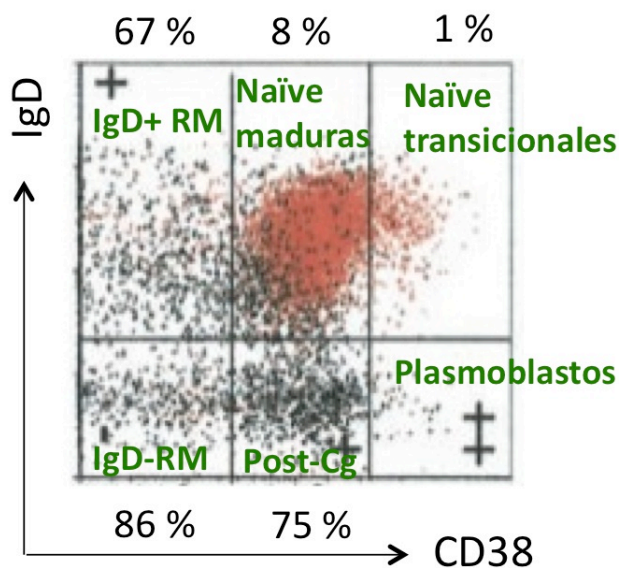


Figura 4: Subpoblaciones de linfocitos B en base a los marcadores IgD/CD38, en combinación con el marcador CD27 de célula memoria.

Las células de color negro son CD27⁺; el porcentaje que acompaña cada subtipo celular indicaría qué porcentaje es CD27⁺. Los subtipos celulares descritos son: *naïve* transicionales (IgD⁺CD38⁺⁺), *naïve* maduras (IgD⁺CD38⁺), IgD⁻ *resting memory* (IgD⁻CD38⁻), IgD⁺ *resting memory* (IgD⁺CD38⁻), memoria post-centro germinal (IgD⁻CD38⁺) y plasmoblastos (IgD⁻CD38⁺⁺⁺). Modificado de Bohnhorst et al. "Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome"

Por tanto, la combinación entre los marcadores IgD/CD27/CD38 utilizada permite hacer equivalencias entre los subtipos de células B memoria descritos. Las células IgD⁺ *resting memory* corresponderían a células memoria B *pre-switch*, y tanto las células IgD⁻ *resting memory* como las células post-GC serían células B memoria *post-switch*.

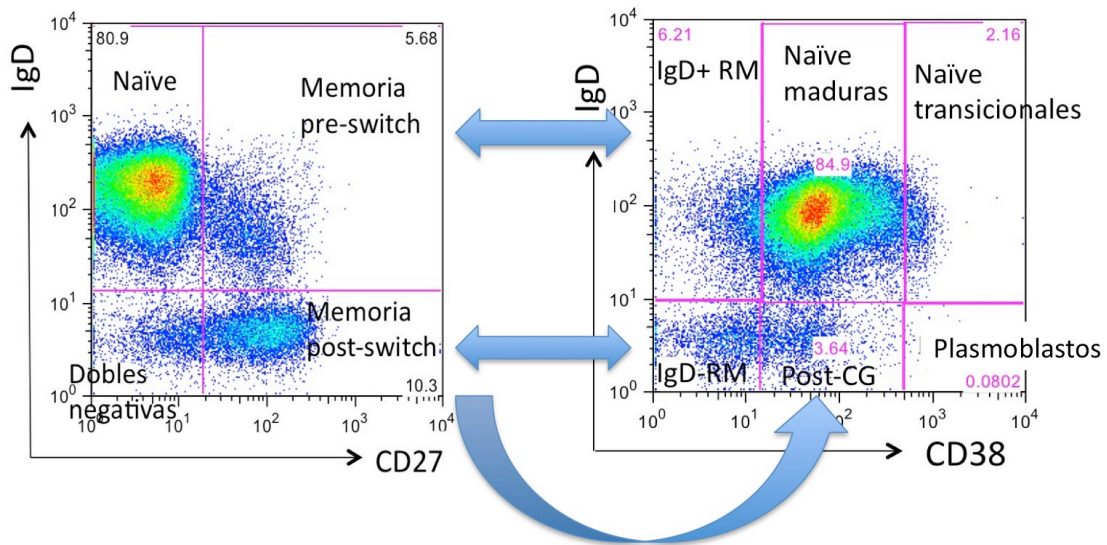


Figura 5: Equivalencia entre los subtipos de células B memoria.

Las células IgD⁺ *resting memory* serían equivalentes a las células memoria B *pre-switch*, y tanto las células IgD⁻ *resting memory* como las células post-GC serían células B memoria *post-switch*.

La memoria inmunológica reside en los linfocitos B y T de vida media larga que derivan de la respuesta inmunitaria inicial. Después del reconocimiento antigénico, las células B maduras proliferan y pueden optimizar su unión al Ac por hipermutación somática (SHM: somatic hypermutation), es decir, introduciendo mutaciones puntuales en los exones V(D)J de sus cadenas de Ig pesadas y ligeras, y seleccionando células mutadas de alta afinidad [17]. Además, las acciones efectoras del anticuerpo (Ac) pueden modificarse por el cambio de clase de Ig (CSR: class-switch recombination), por el que cambia el isotipo de la región constante *IGH* de ν a α , δ , ϵ o γ [18].

Los CG son estructuras especializadas de los órganos linfoides secundarios, implicadas en la maduración de la afinidad de respuestas T-dependientes a través de la proliferación de B células, hipermutación somática, cambio de clase de las Ig y selección de linfocitos B respondedores al Ag. La zona marginal del bazo es una estructura circular alrededor de los folículos de los linfocitos B. Está compuesta principalmente por linfocitos B de la zona marginal, que se ocupan de respuestas al Ag que son T-independientes. Los linfocitos B de la zona marginal se caracterizan por un fenotipo sIgM^{alto}sIgD^{bajo}CD27+ [19].

El reconocimiento del Ag se produce a través del BCR, pero los linfocitos B necesitan una segunda señal para activarse. En las respuestas T-dependientes, las células T activadas proporcionan una señal a través del ligando CD40 (CD40L), que interacciona con el receptor de coestimulación CD40 del linfocito B. Estas respuestas se caracterizan por la formación de CG, proliferación extensa de linfocitos B, maduración de la afinidad, y cambio de clase de Ig, formando células B memoria de alta afinidad y células plasmáticas secretoras de Ig [20]. Las células B también responden a los Ag mediante respuestas T-independientes, en la zona marginal del bazo y las mucosas [21].

Los linfocitos B conducen los procesos inflamatorios implicados en la patogénesis de la AR mediante distintos mecanismos. Son los precursores de las células plasmáticas de vida media corta que producen los autoanticuerpos, que son capaces de formar inmunocomplejos pequeños. Estos interactúan con el receptor Fcγ tipo IIIa (FcγIIIa) en macrófagos en las articulaciones y otros tejidos [8], que pueden ser los responsables de la producción de citoquinas proinflamatorias [22, 23]. Las células B también son células presentadoras de Ag y activadoras de linfocitos T [24].

Terapia de depleción de células B con anticuerpos monoclonales anti-CD20 (Rituximab®)

RTX es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano, que se une específicamente a la molécula CD20 expresada en la superficie de las células B humanas. Se desarrolló inicialmente para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B, siendo aprobado en 1997 [25, 26]. En 2006 se aprobó para el tratamiento de la AR refractaria, y en 2014 se autorizó para el tratamiento de la granulomatosis con poliangéitis grave (granulomatosis de Wegener) y poliangéitis microscópica. Actualmente se utiliza frecuentemente en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT).

El CD20 es una fosfoproteína no glucosilada que se expresa en altas concentraciones en la superficie de casi todos los linfocitos B. CD20 se encuentra en los dominios lipídicos de la membrana plasmática, donde funciona probablemente como un canal de calcio tras la unión entre el Ag y el BCR [27]. CD20 permite la acumulación de Ac monoclonales en la superficie de la célula. RTX depleciona las células B mediante varios mecanismos, como citotoxicidad dependiente de complemento, citotoxicidad celular dependiente del Ac, activación de la señalización intracelular y apoptosis [28].

Por tanto, RTX producirá una extensa depleción de células B en sangre periférica y otros tejidos [29], pero la molécula CD20 no se expresa en las células madre en MO ni en los precursores tempranos del linfocito B (células pro-B) o en las células plasmáticas diferenciadas, por lo que RTX no las deplecionará [30, 31]. Las células

plasmáticas de vida media larga sobreviven y continúan la producción de Ig, pero los plasmoblastos de vida media corta no se reemplazarán, pues sus precursores están deplecionados.

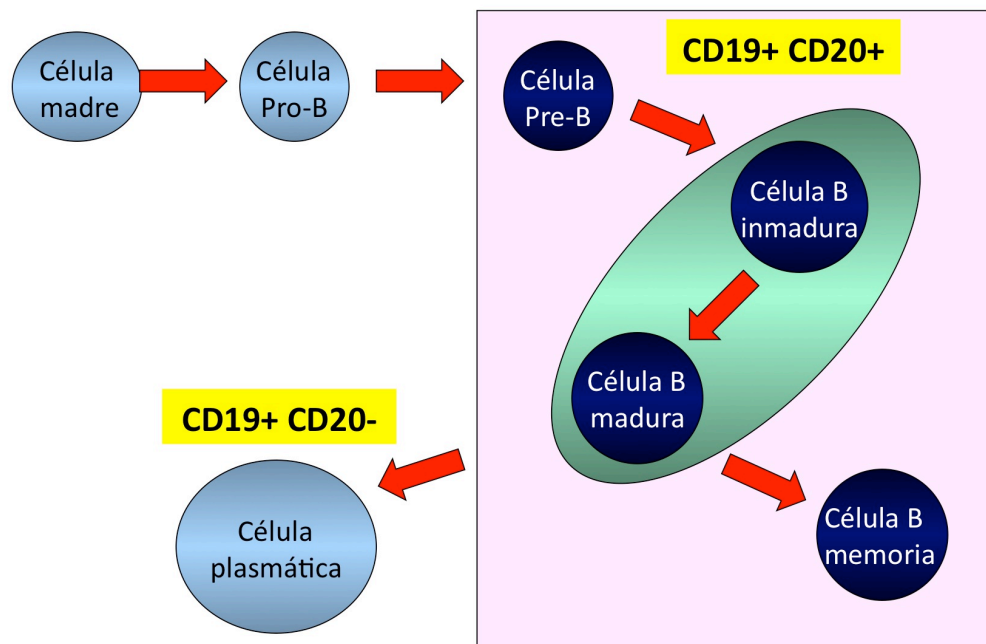


Figura 6: Linfocitos B CD20+.

RTX depleciona las células B CD20+, esto es, células pre-B, células B inmaduras, maduras y memoria, pero no afecta a las células madre, células pro-B o células plasmáticas.

Los efectos beneficiosos de la depleción de células B tienen probablemente relación con su mayor influencia sobre las células plasmáticas autorreactivas, pues afectan a los linfocitos autorreactivos más que a la inmunidad humoral protectora, ya que los niveles de Ig protectoras suelen preservarse [32].

Una vez que RTX está presente en plasma, interfiere con la medición de CD20 por citometría. Por ello, para confirmar la depleción de células B se requiere otro marcador del linfocito B. CD19 es un marcador de superficie también presente en las

células B, por lo que se usa para el análisis del linfocito B tras el tratamiento con RTX [33].

La repoblación periférica de linfocitos B suele comenzar 6-9 meses después del tratamiento con RTX, y se inicia con células B *naïve*, de forma similar a lo que ocurre tras un trasplante de MO [34-36]. La repoblación se ha investigado en distintas enfermedades tratadas con RTX, incluyendo el linfoma, LES y AR, con resultados similares, por lo que parece seguir el proceso normal de ontogenia de las células B [37-40].

Se ha descrito la formación de Ac anti-quiméricos humanos (HACAs: human anti-chimaeric antibodies) por el tratamiento con RTX, pero no se ha encontrado ninguna asociación entre la aparición de HACAs y la respuesta clínica o la depleción de linfocitos en pacientes con AR [41]. Se han comparado los niveles de RTX entre los pacientes con AR y LES, encontrando una clara variabilidad entre ambas enfermedades, con un aclaramiento del fármaco más rápido en pacientes con LES. Esto puede explicar la depleción incompleta de linfocitos B objetivada más frecuentemente en pacientes con LES tratados con RTX [42].

Célula B, Rituximab y artritis reumatoide

Basándose en la hipótesis del papel del linfocito B en la patogénesis de la AR [43], los investigadores de University College London (UCL) comenzaron a tratar pacientes con AR mediante terapia de depleción de linfocitos B con RTX en 1998. Los primeros resultados satisfactorios se vieron en 5 pacientes con AR que se incluyeron en

un estudio abierto [44]. Este éxito llevó a la realización de un ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo, que confirmaba la eficacia y seguridad de RTX en los pacientes con AR [33].

RTX se autorizó para el tratamiento de la AR refractaria en 2006. En Europa se usa en pacientes con AR que han fallado al menos a un fármaco anti-TNF. Hay suficiente evidencia científica para utilizarlo como primer biológico en pacientes que no pueden recibir anti-TNF. Ya hay disponibles datos sobre la eficacia y seguridad a largo plazo de las fases de extensión de los ensayos iniciales [45-49], y un consenso EULAR reciente resume las recomendaciones de uso de RTX en AR [50].

La AR es una enfermedad heterogénea en la que pueden identificarse distintos subgrupos de pacientes según el mecanismo inmune predominante en su patogenia [51]. Los pacientes con FR+, Ac anti-PCC + y concentraciones elevadas de IgG responden mejor a la terapia con RTX, dado que estos son marcadores de un subtipo de enfermedad con un papel predominante del linfocito B. Los niveles de FR y Ac anti-PCC no se asocian con una respuesta clínica particular [52].

Estudios de células B en AR

En AR, los primeros estudios realizados después de la depleción terapéutica de células B con RTX confirmaron una depleción completa de linfocitos B en sangre periférica [37, 38]. La mayoría de células B residuales mostraban un fenotipo de células memoria o precursores de células plasmáticas CD20-. No se produjo ninguna recaída clínica antes de la repoblación periférica.

El siguiente gráfico muestra un ejemplo de análisis citométrico en un paciente que había recibido RTX, en el que persistía la depleción de células B CD19+ a los 6 meses del tratamiento. Las células B identificadas son células B memoria y plasmoblastos.

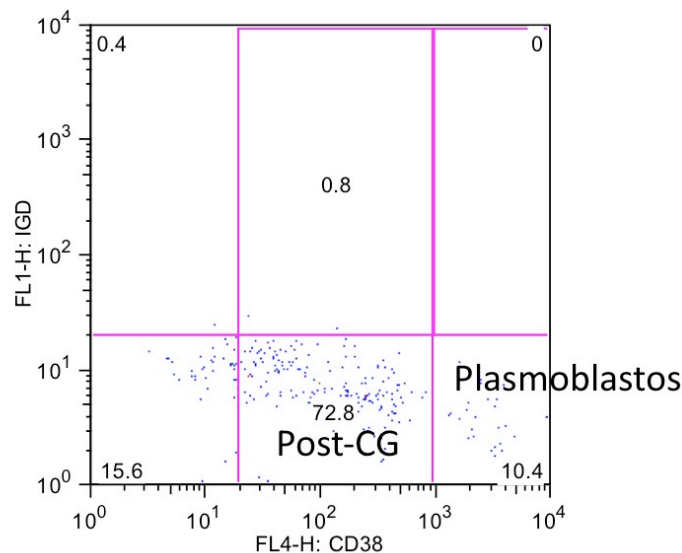


Figura 7: Estudio citométrico de un paciente con depleción de células B CD19+ a los 6 meses de tratamiento con RTX.

Las células B identificadas son células B memoria y plasmoblastos que no han sido deplecionadas; no se ven células B *naïve*.

La repoblación de células B se inicia principalmente con linfocitos B *naïve*, reapareciendo primero los linfocitos B *naïve* transicionales, que se convierten rápidamente en linfocitos B maduros [37, 38]. Sin embargo, el *pool* de linfocitos B memoria permanece muy reducido durante más de 2 años tras un solo ciclo de RTX, con una recuperación muy lenta [38]. Después del segundo ciclo de RTX, la repoblación periférica de linfocitos B sigue un patrón similar [53]. La repoblación con un número elevado de linfocitos B memoria [37, 53, 54] y plasmoblastos se asocia con una recaída más precoz [37, 54].

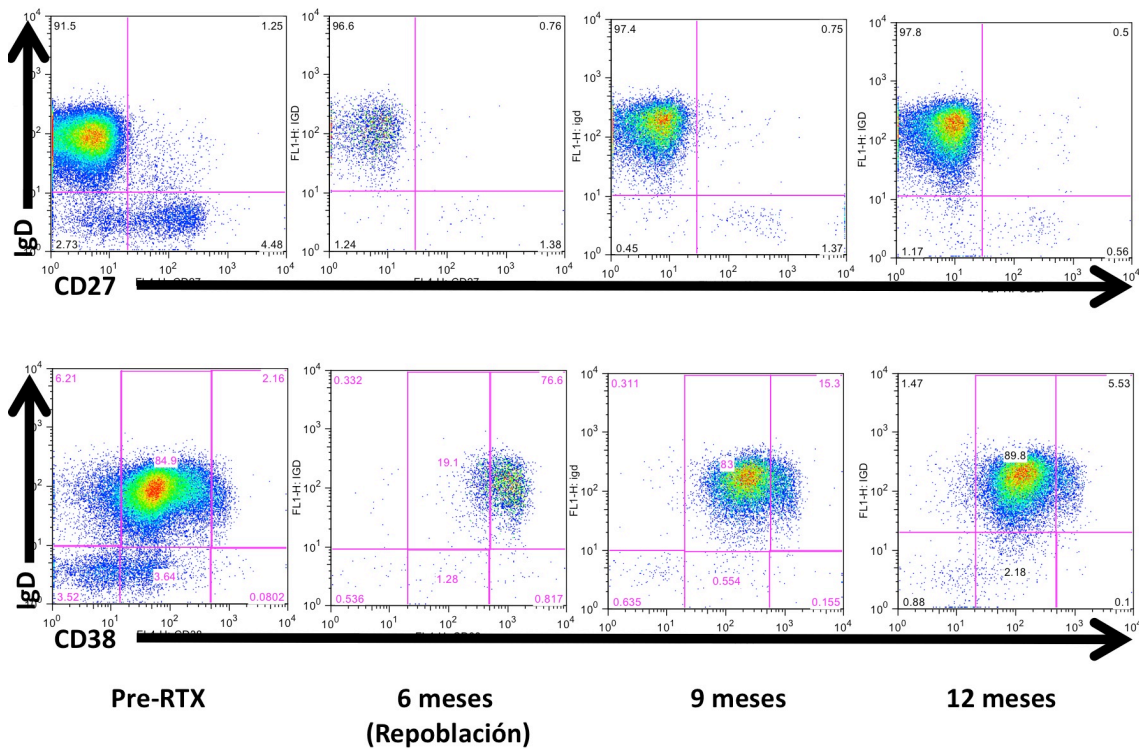


Figura 8: Estudio citométrico pre y post-RTX utilizando los marcadores IgD/CD27 e IgD/CD38.

Estudio de un paciente con AR previamente al tratamiento con RTX, a los 6 meses de tratamiento coincidiendo con la repoblación de linfocitos B, a los 9 y 12 meses de tratamiento. Las células B predominantes en el momento de la repoblación son *naïve* transicionales, a los 9 y 12 meses se observa que gran parte se ha transformado en *naïve* maduras; el porcentaje de células B memoria permanece reducido.

Dass et al estudiaron la depleción de linfocitos B mediante citometría de flujo de alta sensibilidad; describieron una peor respuesta al tratamiento en pacientes con AR en los que se encontraban linfocitos B pre-plasmáticos persistentes en sangre periférica [55]. Los mismos autores mostraron que un ciclo adicional de RTX podía mejorar la depleción terapéutica y respuesta clínica en pacientes que no habían respondido a un ciclo inicial de RTX [56]. La depleción incompleta de células B en sangre periférica se define como contajes de células B CD19+ superiores a 5×10^6 células/L, valorados mediante citometría de flujo de alta sensibilidad. No es común en pacientes con AR

tratados con RTX, pero es más frecuente en LES y otras enfermedades autoinmunes [57].

El motivo por el que algunos linfocitos B memoria no son deplecionados por RTX no está claro. Se ha asociado un mayor porcentaje de células B memoria antes del tratamiento con una peor respuesta a RTX [53, 58]. La depleción de linfocitos B en tejidos sólidos es significativa pero no completa, y varía mucho entre individuos. La depleción es más pronunciada en el bazo que en los nódulos linfoides, aunque los datos de la literatura son muy limitados porque los estudios se han realizado en animales [29, 59]. Por tanto, los linfocitos B residuales sobreviven en los tejidos linfoides secundarios y otros órganos sólidos. Los estudios realizados en MO después de la depleción terapéutica de linfocitos B muestran precursores de células B, además de células plasmáticas CD20- y células B memoria [30, 60, 61].

Estudios *in vitro* muestran que si se incuban linfocitos B humanos normales de sangre periférica con RTX se inhibe la proliferación de células B *naïve*, pero no de células B memoria CD27 + [62]. Esto puede sugerir que las células B expuestas a RTX pero no deplecionadas pueden tener una función alterada. Estas células residuales no son capaces de expandirse y repoblar la población de células B, pero pueden ser reclutadas en una respuesta inmunológica secundaria [37].

Las células plasmáticas no se deplecionan directamente por los Ac monoclonales anti-CD20, lo cual explicaría por qué los niveles de Ig permanecen en un rango normal tras tratamiento con un solo ciclo de RTX. Los niveles séricos de autoanticuerpos, esto es, IgA-FR, IgG-FR, IgM-FR y anti-PCC, se reducen después de la administración de

RTX en una proporción mayor que los niveles totales de Ig o los Ac antimicrobianos [63]. Esto sugiere que las células plasmáticas de vida media corta, que dependen de la formación de nuevas células B, son las que producen los autoanticuerpos. RTX reduciría selectivamente la formación de células plasmáticas de vida media corta [32, 64, 65]. Estas células también producen IgM, cuyos niveles se reducen desde el primer ciclo de RTX, con mayores reducciones en ciclos repetidos de tratamiento [64, 66-68]. Sin embargo, la IgG es producida por células plasmáticas de vida media larga, que no se deplecionan con RTX, por lo que los niveles de IgG son más estables y se reducen en menor proporción con ciclos repetidos de tratamiento; además tienden a aumentar con la repoblación periférica de linfocitos B [67].

Los estudios sinoviales han mostrado que RTX puede reducir el número de células B en el tejido sinovial, pero la depleción es más lenta que en sangre periférica, sugiriendo que hay mecanismos que predisponen a la persistencia de células B en esas localizaciones. Este puede ser el motivo por el que la mejoría de los síntomas en AR no se produce hasta semanas después de la administración de RTX, a pesar de la rápida depleción de linfocitos B en sangre periférica [65, 69]. Se han encontrado células plasmáticas persistentes en tejidos sinoviales de algunos pacientes tratados con RTX, y se ha relacionado con una peor respuesta al tratamiento [70]. También se encontraron células B memoria “*post-switch*” en tejidos sinoviales de articulaciones activas [65].

Tras la depleción de linfocitos B, el tiempo hasta la repoblación periférica de linfocitos B depende de la extensión de la depleción, del aclaramiento del fármaco, y de la capacidad de la MO de regenerar linfocitos B [12]. Las recaídas clínicas después de un único ciclo de RTX se producen a veces por depleción incompleta en los tejidos

linfoides secundarios, donde las células B memoria autorreactivas o las células plasmáticas de vida media larga pueden sobrevivir, o bien por células T memoria autorreactivas que favorecerían la autoinmunidad mediada por la célula B [53, 71]. Otros pacientes sin embargo precisan que se generen nuevos clones de células B, que son precursores de células plasmáticas productoras de autoanticuerpos [63].

La repoblación periférica de linfocitos B no conduce necesariamente a una recaída de la enfermedad. La recaída de la enfermedad tras la repoblación de linfocitos B está ligada a la diferenciación a células secretoras de Ig, como muestra el aumento en los niveles de autoanticuerpos [63], la presencia de linfocitos B memoria CD27+ [72, 73] y células plasmáticas circulantes [38, 65, 73]. Por tanto, los mecanismos que explicarían la recaída clínica tras la repoblación periférica están relacionados con la maduración de células B autorreactivas hacia células productoras de autoanticuerpos, o bien desde nuevas células inmaduras, o desde células memoria resistentes a RTX o plasmoblastos CD20- [51].

Experiencia de los pacientes tratados con RTX en UCL

El primer estudio abierto de RTX en pacientes con AR se llevó acabo en UCL en 1998. Se trataron 5 pacientes con AR que cumplían los criterios diagnósticos de la enfermedad según la clasificación ACR 1987 [44]. Todos los pacientes presentaban FR+, y recibieron RTX, ciclofosfamida (CYC) y corticoides orales. A las 2 semanas todos los pacientes cumplían los criterios de respuesta ACR50. Tres pacientes cumplían los criterios de respuesta ACR70. Dos pacientes recayeron a las 28 y 38 semanas, coincidiendo con la repoblación periférica de linfocitos B, pero en dos pacientes la

repopulación de linfocitos B no condujo a una recaída de la enfermedad. El quinto paciente refería encontrarse bien, pero rechazó el seguimiento.

El segundo estudio realizado en UCL incluyó 22 pacientes que recibieron 5 combinaciones diferentes de RTX, con o sin CYC/corticoides orales [74]. Los pacientes que recibieron dosis mayores de RTX en combinación con CYC presentaron las mejores respuestas. Este estudio permitió el desarrollo de un ensayo clínico de fase II, aleatorizado y doble ciego [33], en el que los pacientes eran asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: MTX (grupo control); RTX (1000 mg en los días 1 y 15), RTX + CYC; RTX + MTX. En todos los pacientes hubo al menos una respuesta ACR20 en comparación con el grupo de MTX, por lo que se concluyó que RTX producía una mejoría significativa en pacientes con AR activa a pesar de tratamiento con MTX.

En los primeros 24 pacientes estudiados en UCL, aproximadamente la mitad recaían en el momento de la repoblación periférica de células B, pero en la otra mitad la recaída se retrasaba hasta incluso 2,5 años después de la repoblación periférica [37, 71, 75]. Con estas observaciones, se describieron dos patrones de recaída: coincidente con la repoblación de linfocitos B o recaída concordante (R-C) o meses después de la repoblación periférica, o recaída discordante (D-R). Además, los pacientes tienden a seguir el mismo patrón de recaída después de ciclos sucesivos [71], por lo que la medición de esos parámetros es determinante para tratar a los pacientes de forma preventiva y evitar recaídas posteriores [76].

Opciones de retratamiento con RTX en AR

Las opciones de retratamiento con RTX en AR incluyen su administración en el momento de la recaída de la enfermedad o cada 6 meses en pauta fija, como se especifica en el consenso de 2011 sobre el uso de RTX en AR. La pauta fija de retratamiento tiene el riesgo de tratar a algunos pacientes que no lo necesitan [50]. Sin embargo, si la enfermedad está activa a las 24 semanas, los pacientes pueden mejorar la respuesta con un segundo ciclo de tratamiento [48, 49, 77]. En UCL describen que los pacientes tienden a responder a cada ciclo de tratamiento un período de tiempo similar a los ciclos previos [71, 76], hecho que también se sugiere en los pacientes en seguimiento en ensayos clínicos [78].

Un estudio realizado entre UCL y el Hospital Gregorio Marañón (Madrid) comparó la incidencia de hipogammaglobulinemia en pacientes con AR que recibían RTX cada 6 meses y pacientes que se trataban a demanda según el esquema de UCL. Objetivaron un mayor descenso en la mediana de los valores de IgM e IgG después del 4º ciclo de tratamiento en pacientes que recibían RTX cada 6 meses. Concluían nuevamente que el tratamiento con un régimen fijo de RTX cada 6 meses podía ser excesivo en una proporción de pacientes por lo que proponían un esquema de tratamiento individualizado para cada paciente después de alcanzar la remisión clínica [79].

Por tanto, el esquema de tratamiento con RTX no puede definirse de forma general, y debería basarse en decisiones individuales según la actividad de la enfermedad del paciente y el período de respuesta a ciclos previos de tratamiento.

Cuando se empezó a utilizar RTX en UCL los pacientes recaían habitualmente y eran retratados según precisaran. Durante los últimos años, el esquema de tratamiento se ha optimizado, y actualmente se da un segundo ciclo de tratamiento a los 6 meses en pacientes que han respondido a la terapia pero en los que persiste enfermedad activa. En pacientes en remisión desde el primer ciclo de tratamiento, se administra un segundo ciclo en cuanto aparecen los primeros síntomas de recaída de la enfermedad. Después de la primera recaída, se planifican ciclos de tratamiento preventivo según la duración de la respuesta al ciclo previo, los niveles de PCR y FR, y se suele dar el siguiente ciclo de RTX habitualmente un mes antes de la fecha esperada de recaída de la enfermedad [76].

Rituximab en otras enfermedades autoinmunes

RTX se ha autorizado para el tratamiento de la granulomatosis con poliangéitis grave (granulomatosis de Wegener) y la poliangéitis microscópica. Actualmente se utiliza frecuentemente en otras enfermedades autoinmunes como LES, síndrome de Sjögren (SS), miopatías inflamatorias y PTT; en la literatura médica pueden encontrarse múltiples estudios que avalan su eficacia en estas patologías, sin embargo los ensayos clínicos no han podido confirmarlo, por lo que actualmente RTX no tiene indicación en estas enfermedades.

Las vasculitis asociadas a Ac anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) son síndromes autoinmunes sistémicos caracterizados por vasculitis de vaso pequeño, con afectación renal en un 70 % de los pacientes. El tratamiento estándar incluye el uso de corticoides a dosis altas y CYC, que son eficaces en un 70-90 % de los pacientes, pero se asocian con serios efectos secundarios y una alta tasa de mortalidad [80]. Diferentes

estudios demuestran remisiones sostenidas de las vasculitis ANCA+ tratadas con RTX [81-83]. Esto condujo al desarrollo de dos ensayos clínicos que se publicaron en 2010. El ensayo “*RAVE*” (*RTX in ANCA-associated vasculitis*) concluyó que RTX no era inferior a CYC para la inducción a la remisión, y podía ser superior en la enfermedad recidivante [84]. El ensayo “*RITUXVAS*” (*RTX vs CYC in ANCA-associated vasculitis*) incluyó pacientes con vasculitis renal, encontrando altas tasas de remisión con ambos tratamientos, sin diferencias significativas en la tasa de efectos adversos [85].

RTX se ha usado muy frecuentemente en LES, y se acepta actualmente como una opción de tratamiento en pacientes refractarios a la terapia habitual [86]. El LES es una enfermedad reumática autoinmune con manifestaciones clínicas muy heterogéneas, caracterizado por la presencia de autoanticuerpos patogénicos. Las células B tienen un papel central en la patogenia de la enfermedad [87], por lo que los agentes que deplecionan linfocitos B o los inhibidores del factor activador de la célula B (BAFF) han adquirido gran importancia en su tratamiento [88].

En UCL, RTX se utilizó por primera vez en LES en el año 2000. El primer estudio, publicado en 2002, mostraba la evolución de 6 mujeres con LES activo tratadas con dos infusiones de RTX 500 mg y dos infusiones de CYC 750 mg. Una paciente perdió el seguimiento, pero las otras 5 pacientes mostraron mejoría a los 6 meses y, al igual que en AR, la mejoría clínica no se limitó únicamente al período de depleción de linfocitos B, apoyando la teoría de los clones de linfocitos B autorreactivos con habilidad para crear un círculo vicioso de producción de autoanticuerpos, después de un tiempo variable tras la repoblación periférica de linfocitos B [89].

En publicaciones posteriores de UCL se aumentó el número de pacientes con LES tratados con RTX hasta 76 pacientes, 24 de los cuales han recibido ciclos repetidos de tratamiento. El esquema de tratamiento se cambió después del primer estudio, utilizando dos infusiones de RTX 1000 mg en combinación con CYC. En todos los pacientes excepto en uno se observó una depleción completa de linfocitos B. El tiempo hasta la repoblación periférica variaba de 2 a 10 meses; los pacientes empeoraron tras un tiempo variable desde la repoblación periférica. Se confirmó una mejoría clínica y serológica, que apoyaba la eficacia y seguridad del uso de RTX como tratamiento del LES [90-94]. Al contrario que en AR, la depleción completa de células B en el LES es muy variable [95], por lo que se continúa usando la combinación de RTX + CYC para conseguir una depleción de células B adecuada.

El primer ensayo clínico de RTX en LES se publicó en 2004. La eficacia clínica del fármaco se confirmó, pero no se objetivaron cambios serológicos significativos, y la depleción de linfocitos B fue muy variable. Es importante remarcar que no se utilizó CYC en combinación con RTX, lo que probablemente explica las diferencias observadas entre este ensayo clínico y los estudios anteriores [57].

Se han publicado múltiples informes de casos y estudios sobre la eficacia y seguridad de RTX en LES, en general apoyando su uso [96-100]. También se ha visto una buena respuesta en nefritis lúpica [101, 102]. Sin embargo, dos ensayos clínicos aleatorizados, a doble ciego, no consiguieron mostrar una respuesta clínica completa o parcial a las 52 semanas del tratamiento [103, 104].

El SS es una patología autoinmune caracterizada por sequedad ocular y oral, junto con manifestaciones sistémicas. El linfocito B juega un papel crucial en el desarrollo, mantenimiento y progresión de la enfermedad [105], por lo que la terapia de depleción de linfocitos B en SS parece una alternativa de tratamiento razonable en esta enfermedad. Los estudios disponibles en la literatura muestran una cierta eficacia del tratamiento, con mejoría de los síntomas de sequedad [106-108], lo cual se ha confirmado en ensayos clínicos aleatorizados frente a placebo, con pacientes que aún continúan en seguimiento [109, 110].

Las miopatías inflamatorias se caracterizan por síntomas de debilidad muscular simétrica y proximal, aumento de enzimas musculares séricos, anomalías electromiográficas, e infiltrados de células inflamatorias en la biopsia muscular [111]. En la literatura pueden encontrarse múltiples informes de casos de mejoría de la enfermedad con RTX [112-114]. Sin embargo, no todos los pacientes responden al tratamiento y parece que aquellos con autoanticuerpos específicos para miositis tienen más posibilidades de respuesta a RTX [115]. El mayor ensayo clínico publicado hasta ahora es el ensayo aleatorizado, doble-ciego “*Rituximab in myositis*” en el que un 83 % de los 200 pacientes reclutados mostraban mejoría. Actualmente hay otros ensayos clínicos aleatorizados en desarrollo [116].

Rituximab en púrpura trombótica trombocitopénica

La PTT es una patología adquirida grave caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y signos de disfunción multiorgánica, con afectación neurológica, cardíaca, renal y abdominal [117]. Se produce por deficiencia o

disfunción de la metaloproteínasa ADAMTS13 [118], que escinde el factor von Willebrand. Su déficit produce aumento de la adhesión plaquetaria y formación de trombos en los vasos de pequeño tamaño [119]. La mayoría de casos se asocian con la producción de autoanticuerpos (IgM/IgG/IgA) frente a ADAMTS13, con predominio de la subclase IgG4, seguida por la IgG1 [120].

Los tratamientos estándar para la PTT incluyen la plasmaféresis y los corticoides, pero muchos pacientes precisan más inmunosupresión [121, 122]. En 2001 se publicó el primer caso clínico que evidenciaba una mejoría de la PTT con RTX [123]. Posteriormente otros estudios han confirmado la eficacia de RTX en el tratamiento de la PTT aguda, con mayor tasa de respuesta e incremento del tiempo medio de recaída en comparación con pacientes que solamente han recibido plasmaféresis [117, 124-127]. El tratamiento con RTX en monoterapia también es muy eficaz como tratamiento preventivo de brotes posteriores de la enfermedad [127]. La remisión tras el tratamiento con RTX junto con plasmaféresis puede prolongarse durante largos períodos tras la repoblación periférica de linfocitos B, y se relaciona con la reducción de la producción de Ac IgG anti-ADAMTS13. Los pacientes no suelen precisar nuevos ciclos de tratamiento con RTX [128]. Por todo ello, se decidió realizar un estudio comparativo entre pacientes con AR y PTT que habían recibido RTX, pues ambas son patologías desencadenadas por la producción de autoanticuerpos, pero la AR, a pesar de la depleción periférica efectiva, suele precisar múltiples ciclos de tratamiento, mientras que la PTT puede mantenerse en remisión con un solo ciclo, permitiendo estudiar los efectos de RTX a largo plazo en las subpoblaciones de células B.

Factor activador de la célula B (BAFF) y receptores de BAFF

Factor activador de la célula B / B-cell activating factor (BAFF)

El factor activador de la célula B o factor estimulante del linfocito B (BAFF / BLyS: B-cell activating factor or B-lymphocyte stimulator), se describió inicialmente en 1999. Es una proteína de 250 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de ligandos del TNF [129, 130]. Se trata de una proteína transmembrana tipo II, que se escinde en formas solubles por medio de convertasas de proteínas y su forma activa está compuesta por homotrímeros [131]. Es secretada por monocitos, macrófagos, neutrófilos activados y células dendríticas, y tiene un papel esencial en la maduración, homeostasis y supervivencia del linfocito B [132, 133].

BAFF puede unirse a tres receptores (BBRs: *BAFF binding receptors*): conocidos como receptor de BAFF (BAFF-R o BR3), *transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor* (TACI) y *B-cell maturation antigen* (BCMA). BAFF es el único ligando de BAFF-R, pero TACI y BCMA pueden unirse a BAFF o a otro ligando de la familia del TNF conocido como APRIL (*A Proliferation Inducing Ligand*). Estas interacciones entre ligando y receptor son de distintas afinidades. BAFF se une con más afinidad a BAFF-R que a BCMA, sin embargo APRIL tiene mayor afinidad por BCMA, sin capacidad para unirse a BAFF-R [134]. BAFF tiene mayor afinidad por TACI que por BCMA, y APRIL mayor afinidad por BCMA que por TACI [135].

Los tres receptores comparten ciertas características. Todos son proteínas transmembrana de tipo III, por lo que no presentan el péptido señalizador encontrado en las proteínas transmembrana de tipo I, que es el tipo de proteína habitual en los receptores de la superfamilia de ligandos del TNF. Además, su expresión está restringida a los linfocitos [136].

Kaur et al describieron un retraso en la maduración de los BBRs en células de neonatos nacidos pre-término, pues expresaban menos TACI, BCMA y BAFF-R en comparación con las células B en adultos. Este hecho podría explicar el menor número de Ac frente a Ag T-independientes, como las bacterias polisacáridas, en neonatos pretérmino, y el aumento de la tasa de infecciones con bacterias encapsuladas [137]. Asimismo, se ha descrito que los niveles de BAFF son mayores en la sangre del cordón umbilical que en sangre periférica de madres, lo cual es probablemente una respuesta fisiológica en recién nacidos que asegura la supervivencia del linfocito B, dado que su sistema inmunológico y el repertorio de células B aún no está completamente desarrollado [138].

Los 3 BBRs se expresan de forma diferente durante el desarrollo de la célula B, según el contexto del ligando BAFF/APRIL [139]. La unión de BAFF a BAFF-R desencadena vías de señalización intracelular que antagonizan la apoptosis de la célula B, promoviendo su supervivencia. Las señales de BAFF a través de BAFF-R actúan a través de la activación de la vía no clásica NF- κ B2, que favorece la regulación positiva de varios miembros de la familia Bcl-2 (antia-poptótica), facilitando la selección de células B [140-142]. TACI y BCMA sin embargo señalizan a través de la vía clásica

NF- κ B1, promoviendo respuestas inflamatorias e inmunidad innata, y facilitando así la maduración de células B [141, 143].

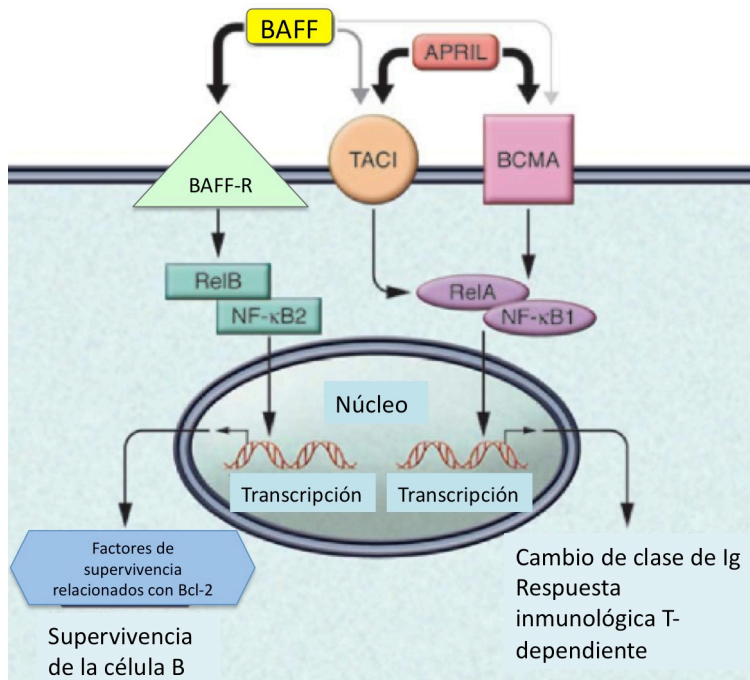


Figura 9: Ligandos y receptores de BAFF y APRIL.

BAFF es el único ligando de BAFF-R, y tanto BAFF como APRIL pueden unirse a TACI y BCMA. Tras la unión del ligando, la señalización intracelular favorece la supervivencia de la célula y actúa sobre su diferenciación. Modificado para AR de Cancro et al: "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".

La célula B depende de BAFF para su supervivencia y selección desde su estado transicional, cuando los linfocitos B inmaduros, que son los primeros en expresar BAFF-R y TACI, salen de la MO y pasan a la circulación [144]. Las células B inmaduras tempranas expresan BAFF-R pero muy poco TACI, mientras que las células maduras mantienen la expresión de BAFF-R y aumentan la expresión de TACI durante el proceso de maduración. Estas células pueden convertirse en células foliculares y de centros germinales, que expresan los niveles más altos de BAFF-R y TACI [145].

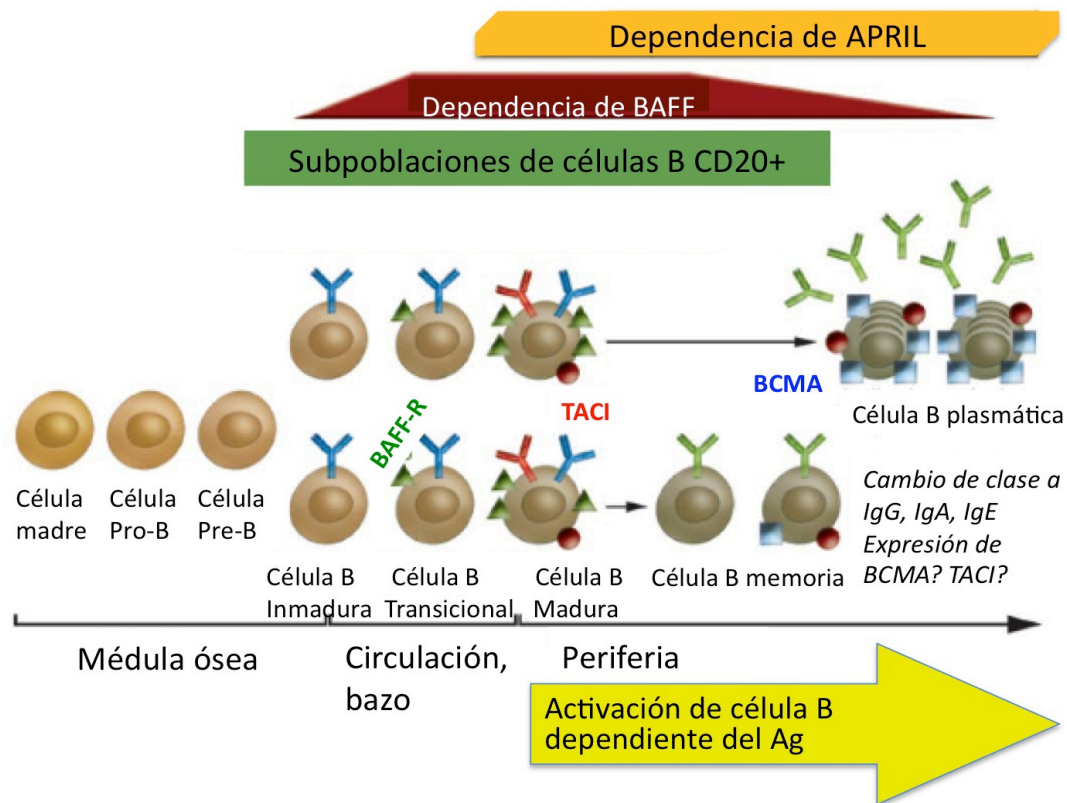


Figura 10: Diferenciación y activación de la célula B y expresión de BBRs.

La dependencia de BAFF se inicia en el estado transicional, cuando se expresan BAFF-R y TACI. Después de la activación de la célula B por parte del Ag, la expresión de BAFF-R disminuye, con aumento de la expresión de BCMA. Modificado para AR de Cancro et al: "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".

BAFF tiene dos funciones en el establecimiento y mantenimiento de las células B primarias. Primero, es el regulador clave del proceso de maduración de las células B, ya que controla los distintas etapas de diferenciación de la célula. Segundo, mantiene la tolerancia de células B, pues contribuye a la regulación de la depleción de células anérgicas, como mecanismo de control de la tolerancia de la célula B en sangre periférica [144].

Sin embargo, se ha implicado a BAFF en fenómenos de autoinmunidad a través de la activación de células B autorreactivas de baja afinidad, independiente del linfocito

T [133]. El exceso de BAFF puede alterar el mecanismo de control de células B que ocurre en la periferia, pues puede rescatar clones de células B autorreactivas en sangre periférica que pueden haber escapado los filtros de selección, y permitir que maduren. Las células anérgicas compiten por BAFF, y solamente sobrevivirán si éste está elevado. Las células B que se eliminan por selección en la MO en su etapa inmadura no son rescatadas por el exceso de BAFF, pues aún no expresan BAFF-R [146].

De esta forma, BAFF regula el umbral de la selección de linfocitos B mediado por su BCR en su etapa transicional. Las células B que presentan una señalización más intensa a través de su BCR deberían ser eliminadas a través de su selección negativa. Sin embargo, los niveles elevados de BAFF permiten que se acepte una señalización más intensa a través del BCR, por lo que sobrevive un mayor número de células transicionales. Los niveles reducidos de BAFF aumentarían la severidad de la selección de linfocitos B, por lo que habría menor número de células B de lo normal [147, 148].

Los niveles de BAFF están elevados en diferentes enfermedades autoinmunes, como el SS o el LES [149], y en algunos pacientes con PTT aguda [150]. Los niveles de BAFF en pacientes con AR que no han recibido RTX son similares a los controles sanos [58, 71, 72]. Sin embargo, se cree que los niveles de BAFF crónicamente elevados producen una retroalimentación negativa en la expresión de BAFF-R [149].

Otras publicaciones recientes sugieren que BAFF tiene dos funciones en los CG. A nivel sistémico, BAFF mantiene las células B *naïve* suficientes para su reposición a nivel del CG, presentación antigénica, y organogénesis. Sin embargo, en el microambiente del CG los niveles de BAFF son muy reducidos, pues el BAFF anclado

en la superficie de la célula se pierde con la activación del linfocito B [151], por lo que en ese momento la célula B depende de la producción de células T. La producción local de BAFF por las células T helper foliculares no es esencial para la celularidad normal del CG y la hipermutación somática, pero sí es necesaria para promover la supervivencia de linfocitos B que produzcan Ac de alta afinidad. Por tanto los autores sugieren que la sobreproducción de BAFF, el aumento inapropiado de la expresión de BAFF-R o la reducción de TACI pueden alterar la selección en el CG y conducir a fenómenos de autoinmunidad [152, 153].

De esta forma, BAFF promueve la diferenciación de las células B memoria a células secretoras de Ig, mediante un mecanismo dependiente del linfocito T. Sin embargo, BAFF también puede tener un papel inhibitorio en la diferenciación de la célula B, a través de señales reguladoras independientes del linfocito T, fuera de los CG; así protege el balance entre células B memoria y células secretoras de Ig [151].

Kreuzaler et al describieron una correlación inversa entre los niveles de BAFF soluble y el número de linfocitos B periféricos y su expresión de BBR. Estudiaron pacientes con inmunodeficiencias primarias, como pacientes con inmunodeficiencia común variable (CVID: *common variable immunodeficiency*), deficiencias de BAFF-R o TACI, y encontraron que tenían niveles más altos de BAFF que pacientes con leucemia linfática crónica, pacientes que habían recibido RTX, con depleción de sus linfocitos B, o controles sanos. Concluyeron que la concentración de BAFF soluble dependía del número de linfocitos B y la expresión de los BBR, sin embargo no estudiaron la correlación entre los niveles de BAFF y la expresión de BBR en pacientes

que estaban en proceso de repoblación periférica de linfocitos B después de la depleción con RTX [138].

Niveles de BAFF después de la depleción de células B

Cambridge et al estudiaron los cambios en los niveles de BAFF en pacientes con AR y LES tratados con terapia de depleción de linfocitos B. En pacientes con AR, los niveles de BAFF aumentaron notablemente después de RTX, observando una sólida relación inversa entre los niveles BAFF sérico y la depleción periférica de células B durante los primeros 4 meses después de la terapia. La disminución de los niveles séricos de BAFF se asoció con la reaparición de células B en sangre periférica. Sin embargo, en pacientes con una R-C (en ese estudio se consideró como recaída clínica < 2 meses después de la repoblación de células B) los niveles de BAFF sérico se redujeron rápidamente con la repoblación de células B. En pacientes con una R-D (definida en ese estudio como un intervalo > 5 meses entre el inicio de la repoblación de células B y la recaída de la enfermedad) se vieron niveles significativamente más altos de BAFF en el momento de la repoblación, y una disminución en los niveles de BAFF más lenta y gradual tras la repoblación. No se vieron diferencias en los niveles de BAFF entre ambos grupos en el momento de la recaída [71].

Este estudio destacó varias diferencias entre los pacientes con AR con R-C y R-D tras la terapia de depleción de linfocitos B. En pacientes con R-D, la repoblación de linfocitos B ocurre con una expresión relativamente reducida de la célula B en los tejidos linfoides secundarios. Por tanto, el número total de linfocitos B en el momento de la repoblación periférica es bajo, y los niveles de BAFF permanecerían relativamente

elevados. El porcentaje de linfocitos B autorreactivos en estos pacientes puede ser insuficiente para desencadenar la recaída clínica de la enfermedad en el momento de la repoblación de células B. Gracias a los niveles elevados de BAFF, probablemente las células B patogénicas precisen re-expandirse durante períodos variables de tiempo, hasta tener un número suficiente de células B para producir la recaída clínica de la enfermedad. Sin embargo, en pacientes con R-C la repoblación periférica probablemente coincide con la expansión de linfocitos B en tejidos linfoides secundarios, y los niveles de BAFF no son tan elevados como en los pacientes con R-D [71].

El estudio de Cambridge et al en LES identificó niveles cuantificables de BAFF en suero de 18/25 pacientes antes de recibir la terapia de depleción de linfocitos B. Tres meses después del tratamiento, los niveles de BAFF aumentaron significativamente, y 6-8 meses después de la terapia, los niveles de BAFF se habían reducido en relación con la repoblación periférica de linfocitos B, al igual que se había observado en AR. En ese estudio, los niveles séricos de BAFF en el momento de la repoblación de células B fueron similares en pacientes con recaída de la enfermedad y pacientes que continuaron estables. La respuesta a RTX fue más corta en los pacientes que tenían elevación de BAFF antes del tratamiento con RTX [154].

Se han descrito dos mecanismos que pueden estar relacionados con el aumento de BAFF después de la terapia de depleción de linfocitos B. El primero estaría relacionado con la desaparición de la mayoría de receptores de BAFF presentes en la superficie de las células B. El segundo se relacionaría con un retraso en la regulación de la transcripción del mRNA de BAFF, que conllevaría un aumento de dicha

transcripción. Los niveles de BAFF sérico después de la depleción terapéutica de linfocitos B deben interpretarse con cuidado, pues en este caso no estarían relacionados con la actividad de la enfermedad [155].

La elevación de los niveles de BAFF después de RTX puede contribuir a la supervivencia o regeneración de poblaciones de células B autorreactivas capaces de provocar una recaída de la enfermedad, especialmente en pacientes con AR con R-D tras RTX [71], al igual que en otras patologías autoinmunes como SS o LES [155]. En este caso, podría considerarse el uso de terapias biológicas combinadas con agentes que deplecionan linfocitos B junto con inhibidores de BAFF, pues podría extenderse la remisión de la enfermedad [71, 155].

Receptor del factor activador de la célula B (BAFF-R o BR3)

BAFF-R es una proteína transmembrana de tipo III formada por 184 aminoácidos que se expresa en la superficie de todas las células B Ig+, pero no en las células plasmáticas [156]. BAFF-R se une exclusivamente a BAFF [156].

Los ratones deficientes en BAFF-R tienen una reducción grave del número de linfocitos B periféricos, pues completan su desarrollo hasta su etapa transicional, pero no continúan madurando, por lo que tienen menos células B memoria y de la zona marginal [157]. En humanos, la expresión baja o defectuosa de BAFF-R en inmunodeficiencias primarias produce un aumento de los niveles séricos de BAFF, niveles reducidos de IgM e IgG séricas, aumento de células B transicionales, y reducción de las respuestas inmunes T-independientes. Sin embargo, no se relaciona

con un aumento de la frecuencia de infecciones graves, lo que sugiere que las células B humanas dependen menos de la señalización a través de BAFF-R que las células murinas [158].

En humanos, BAFF-R se expresa en la mayoría (>95 %) de los linfocitos B circulantes, y solamente se une a BAFF [159]. La capacidad de la célula B de ligar BAFF durante su desarrollo aparece a la vez que la expresión de su BCR [160]. Se ha demostrado que cuando las células B transicionales salen de la MO ya expresan BAFF-R, pero los niveles de expresión de BAFF-R son menores que en los linfocitos B maduros, por lo que aumenta paulatinamente con la maduración de la célula B [161]. La ocupación de BAFF-R por BAFF en células B en reposo es relativamente constante [151]. Las células B transicionales son las más sensibles a las señales de supervivencia que libera BAFF mediante BAFF-R, antes de la activación de la célula a través del BCR [162]. La capacidad de fijación de BAFF-R aumenta después de las etapas transicionales, y la expresión más alta de BAFF-R se produce en las células B foliculares y de la zona marginal [163], con bajos niveles de expresión en las células de los CG [156].

La expresión de BAFF-R se reduce cuando las células B se diferencian en células secretoras de Ac y se cree que esto es necesario para la expresión de BCMA. Es posible que, una vez que las células B van a convertirse en células plasmáticas, pierden su BAFF-R para prevenir un bloqueo en la diferenciación de la célula mediado por BAFF. El balance entre la expresión de BAFFR/BCMA puede ser decisivo para la diferenciación del linfocito en una célula B memoria o una célula plasmática [139].

En 208 pacientes con AR estudiados antes del tratamiento con RTX, la expresión de BAFF-R, medida mediante porcentaje e intensidad media de fluorescencia (MFI: *mean fluorescence intensity*) fue normal [58]. De la Torre et al estudiaron los cambios en la expresión de BAFF-R en pacientes con AR con R-C y R-D. Objetivaron que la expresión de BAFF-R en células B *naïve* y memoria estaba reducida tras el tratamiento con RTX, especialmente en los pacientes con R-C, y esta reducción se relacionaba con la recaída clínica independientemente de los niveles séricos de BAFF. Se propuso la hipótesis de que la recaída de la enfermedad en pacientes con AR tratados con RTX podría producirse por ciertos clones de células B con mayor supervivencia, dadas las características de su BCR. La expresión de BAFF-R podría estar relacionada con la re-expansión de clones patogénicos de células B relacionados con la recaída de la enfermedad [72].

Transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI)

TACI difiere de BCMA y BAFF-R por características estructurales únicas [136]. Tiene 2 exones 5' adicionales, lo que permite que se exprese como 2 variantes que contienen uno o dos dominios extracelulares ricos en cisteína, aunque solamente uno parece relevante funcionalmente [164]. TACI puede unirse tanto a APRIL como a BAFF, con la misma alta afinidad [164], y es el único receptor que puede unir heterotrímeros de BAFF/APRIL [165].

Se expresa en una subpoblación de células B *naïve* activadas (menos del 25%), y su expresión aumenta con la activación a través de estímulos T-dependientes e

independientes. Su expresión aumenta inmediatamente después de la activación de la célula B [139]. Se expresa prácticamente en todas las células B memoria, y de forma variable en las células plasmáticas y células B *naïve* maduras [139, 156].

El papel de TACI en las respuestas de las células B es complejo, con distintos resultados funcionales dependiendo del contexto y las condiciones, según describen diferentes autores con experimentos en células murinas y humanas.

El cambio de clase de Ig es uno de los mecanismos por el que los linfocitos B maduros amplían su repertorio genético de Ig. Las Ig adquieren nuevas funciones efectoras reemplazando la cadena pesada de la región constante de IgM con la de IgG, IgA o IgE sin cambiar su especificidad antigénica [166]. El cambio de clase de Ig requiere una señal primaria de un miembro de la familia del TNF, como el CD40L en caso de la vía T-dependiente, o BAFF/APRIL que interacciona con TACI a través de una vía T-independiente más rápida [167].

TACI está involucrado en la producción de IgM por una vía independiente de CD40, en colaboración con la señalización a través de los receptores de tipo Toll (TLR: *toll-like receptors*) y principalmente a través de la vía ERK/JNK [168]. Tiene un papel crucial en el inicio del cambio de clase de Ig a través de la vía T-independiente descrita [169]. En células B de ratones deficientes en TACI no se produjo el cambio de clase de Ig en presencia de BAFF [170].

Sin embargo, TACI también tiene un papel importante en la regulación negativa de la homeostasis de las células B maduras. El número de estas células está aumentado

en ratones deficientes en TACI [171]. La señalización a través de agonistas de TACI puede atenuar la producción de Ac inducida por CD40 y BAFF-R. BAFF estimularía inicialmente las células B a través de BAFF-R, y después suprimiría las respuestas del linfocito B estimuladas por BAFF-R y CD40 mediante el aumento de TACI. Así, BAFF regularía tanto las respuestas T-dependientes como independientes, a través de un balance dinámico entre la señalización por TACI y BAFF-R/CD40 [172]. Además, TACI puede inducir directamente la apoptosis en ciertas condiciones [171].

Las células B foliculares expresan tanto BAFF-R como TACI [163]. Sin embargo, TACI se reduce en las células B de los CG a través de señales como la IL-21, en el contexto de la señalización a través del BCR y coestimulación a través de CD40, limitando la capacidad de la célula para unir BAFF. Por tanto, TACI es crítico para la retención de BAFF en las células B foliculares, y su reducción explica la distribución desigual de BAFF entre los folículos (microambiente rico en BAFF) y los CG (microambiente pobre en BAFF) [153].

Sakurai et al describieron que, *in vitro*, TACI era un regulador positivo de la producción de IgA inducida por APRIL, pero un regulador negativo de la proliferación de células B y la producción de Ac mediada por BAFF. Los autores sugerían una regulación negativa de TACI mediada por la vía BAFF/TACI, y una regulación positiva mediada por la vía APRIL/TACI [173].

La falta de expresión de TACI produce una reducción en los niveles séricos de IgA e IgG, pero un aumento del número de células B, que se atribuye a la pérdida de las señales inhibitorias de TACI hacia las respuestas mediadas por BAFF-R y CD40. El

déficit de TACI se asocia con dos formas de inmunodeficiencia, CVID y deficiencia de IgA [174, 175], lo que demuestra que TACI es necesario en la función de las células B.

Sin embargo, otros autores sugieren que TACI puede aumentar la diferenciación a células plasmáticas mediada por CD40 [169, 176]. En conjunto, se cree que los efectos reguladores de TACI dependerán de la etapa de diferenciación y activación de la célula B [136].

B-cell maturation antigen (BCMA)

BCMA se expresa de forma predominante en el aparato de Golgi [177], mientras que su expresión en la superficie de células B normales es baja. Su expresión está prácticamente restringida a las células plasmáticas maduras en la MO y los órganos linfoides secundarios [139], aunque los plasmoblastos de vida media corta pueden expresar tanto BAFF-R como BCMA, y es crítica para mantener la supervivencia de las células plasmáticas de vida media larga de la MO [178].

El papel de este receptor adquiere importancia en las células malignas del mieloma múltiple (MM), en las que sí está presente en la superficie celular, y puede contribuir al crecimiento y la supervivencia de células plasmáticas malignas [179]. Hay varios estudios en LES que también describen una mayor expresión de BCMA en células de pacientes con LES en comparación con los controles sanos [180-182].

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La identificación de los mecanismos que explicarían los patrones de R-C y R-D de la AR tratada con RTX puede ayudar a encontrar marcadores de recaída de la enfermedad, que permitan tratar a los pacientes de forma precoz. También puede servir para plantear combinaciones de tratamientos biológicos entre agentes que deplecionan linfocitos B y nuevos fármacos biológicos dirigidos contra la familia BAFF/receptores de BAFF, lo cual podría prolongar el tiempo de respuesta al tratamiento.

Las alteraciones en la tolerancia central del linfocito B en MO no son suficientes para explicar por qué algunos pacientes con AR no recaen inmediatamente después de la repoblación periférica de linfocitos B, precisando una expansión suficiente de células B autorreactivas. Se necesita identificar otros mecanismos que permitan la expansión de células autorreactivas [183]. Por ello, estudios más recientes se han focalizado en la función de BAFF, pues tiene un papel importante en la maduración, homeostasis y supervivencia de la célula B [133]. Los niveles de BAFF aumentan tras la depleción terapéutica de células B, reduciéndose en el momento de la repoblación, pero no a los niveles que presentaban antes del tratamiento. Se ha identificado una expresión reducida de BAFF-R coincidente con la recaída de la enfermedad, especialmente en pacientes con R-C. Probablemente la recaída se produce por la presencia de células B tempranas autorreactivas que superan las consecuencias de una menor expresión de BAFF-R y por tanto de una señalización reducida a través del sistema BAFF/BAFF-R [72].

En este estudio se ha planteado asimismo la comparación de la AR con otra enfermedad tratada con RTX, buscando similitudes o diferencias en el comportamiento de la célula B durante la repoblación de células B. Se ha optado por estudiar la PTT, pues es también una enfermedad autoinmune directamente asociada a la producción de autoanticuerpos (en este caso frente a ADAMTS13), con buena respuesta a RTX. La ventaja del estudio de esta enfermedad es que, al contrario que en la AR, los pacientes suelen permanecer en remisión prolongada tras un único ciclo de tratamiento, lo cual permite estudiar la evolución de las subpoblaciones de células B y el sistema BAFF/BAFF-R años después de haber recibido RTX.

Por tanto, el estudio de BAFF y sus receptores (BAFF-R, TACI y BCMA) puede encontrar diferencias entre los patrones de recaída descritos en AR tras RTX. Alternativamente, los cambios en BAFF-R también puede estar en relación con el proceso de repoblación de células B tras el tratamiento con RTX, e identificarse en otras enfermedades tratadas con RTX, con cambios dependientes del tiempo transcurrido desde que se administró el tratamiento o desde la repoblación periférica de linfocitos B. Por ello, inicialmente se ha hecho el análisis de BBRs en pacientes con AR, con especial atención a una posible correlación con el tiempo transcurrido desde la repoblación periférica de células B. Posteriormente se ha hecho un estudio comparativo con pacientes con PTT en el momento de la repoblación tras RTX, y se han analizado pacientes con PTT en remisión prolongada tras un solo ciclo de RTX.

HIPÓTESIS:

Los dos patrones de recaída clínica observados en AR tras la repoblación periférica de linfocitos B posterior a la terapia de depleción de linfocitos B con RTX podrían explicarse por diferencias en la expresión de los receptores de BAFF.

OBJETIVOS:

Principal:

- Analizar las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de los receptores de BAFF en controles sanos y pacientes con AR divididos en tres grupos: pre-RTX, R-C y R-D. En los pacientes estudiados después de RTX, se analizará la correlación de estos datos con el tiempo hasta la repoblación periférica de linfocitos B.

Secundarios:

- Realizar un estudio retrospectivo observacional de la cohorte de pacientes con AR en tratamiento con RTX en UCL, seleccionando pacientes con una buena respuesta al primer ciclo de RTX y analizando el patrón de recaída de la enfermedad después del primer ciclo de tratamiento.
- Comparar los resultados de los pacientes con AR en el momento de la repoblación periférica con pacientes con PTT también tratados con RTX, analizando las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R, y correlacionando estos datos con el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

- Análisis de la cohorte de pacientes con AR tratada con RTX en UCL:
 - Estudio de cohortes retrospectivo.

- Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de los receptores de BAFF en pacientes con AR tratados con RTX:
 - Estudio transversal de pacientes con AR antes del inicio del tratamiento, con R-C de la enfermedad y con R-D.
 - Seguimiento prospectivo longitudinal de 4 pacientes con AR con muestras recogidas antes y después del tratamiento, con determinaciones de las variables en el momento de la repoblación periférica de linfocitos B y en varios momentos después de la repoblación.

- Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión BAFF-R en pacientes con PTT, comparando los resultados con pacientes con AR:
 - Estudio transversal.

Población

- a) Análisis de la cohorte de pacientes con AR tratada con RTX en UCL.

Se revisó la cohorte de pacientes con AR que ha recibido tratamiento con RTX en UCL entre los años 1998-2012. Todos los pacientes cumplían los criterios diagnósticos ACR de 1987 [2]. El tratamiento consistía en 2 infusiones de 1 gr de RTX separadas 1-2 semanas, cada una de ellas precedida de tratamiento con 100 mg de metilprednisolona [75]. El estudio fue aprobado por el comité ético de UCL, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

Para el estudio se seleccionaron todos los pacientes de la cohorte que habían tenido una buena respuesta al primer ciclo de RTX, y se analizó el patrón de recaída después de la repoblación periférica de linfocitos B.

Todos los pacientes tratados tenían una enfermedad activa antes del inicio de la terapia (DAS28-*Disease activity score* > 5.1). El DAS28 es un índice que se utiliza para evaluar el grado de actividad inflamatoria de la enfermedad. Se calcula en base a 4 datos: el número de articulaciones dolorosas, número de articulaciones inflamadas, ambas en base a un recuento simplificado de 28 articulaciones, escala analógica del dolor por parte del paciente, y el valor de la VSG.

La recaída clínica se definió como: (i) cualquier empeoramiento de los síntomas o signos inflamatorios según la valoración del médico que evaluaba al paciente en consulta; con o sin (ii) aumento de la PCR [63]. Es destacable que la medición de DAS-28 no se utiliza en UCL rutinariamente para decidir ciclos de retratamiento, aunque se valoran siempre las articulaciones y los marcadores inflamatorios. DAS-28 tiene varios inconvenientes: utiliza la VSG en lugar de la PCR, el conteo articular y la valoración

del paciente son subjetivos, y además da el mismo valor a articulaciones pequeñas que grandes [184].

b) Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de los receptores de BAFF pacientes con AR tratados con RTX.

Se obtuvieron muestras de 5 controles sanos (CS) y 37 pacientes con AR, seleccionados de la cohorte de pacientes con AR en tratamiento con RTX de UCL descrita previamente. Se seleccionaron 20 pacientes con DAS28>5.1 antes de recibir el tratamiento (pacientes pre-RTX). Se seleccionaron 21 pacientes con buena respuesta a uno o más ciclos de RTX, y recaída clínica después de la repoblación periférica de linfocitos B (pacientes post-RTX). Cuatro de los pacientes se siguieron longitudinalmente, por lo que se trata de pacientes con muestras disponibles antes del inicio del tratamiento y en el momento de la recaída (pacientes 10, 11, 13, 14).

Los pacientes post-RTX se dividieron en 2 grupos, dependiendo del tipo de recaída presentada:

- R-C: Recaída 0-3 meses después del inicio de la repoblación periférica de linfocitos B: 11 pacientes.
- R-D: Recaída > 3 meses después de la repoblación periférica de linfocitos B: 10 pacientes.

c) Análisis de las subpoblaciones de células B, los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R en pacientes con TTP

Se obtuvieron muestras de 19 pacientes diagnosticados con PTT, y 12 CS. Uno de los pacientes tenía una muestra disponible antes del tratamiento y en el momento de la repoblación (paciente 1). También se seleccionaron 6 pacientes con AR en el momento de la repoblación periférica de linfocitos B tras un primer ciclo de RTX, para compararlos con pacientes con PTT en el momento de la repoblación.

Todos los pacientes con PTT eran seguidos por el Servicio de Hematología de UCL, y tratados según necesidad clínica. En este caso, la pauta de RTX utilizada en hematología difiere de la utilizada en AR, y consiste en 4-8 infusiones de 375 mg/m², con el objetivo de reducir los niveles de IgG anti-ADAMTS13 y normalizar la actividad de ADAMTS13 [125]. El estudio contaba con la aprobación del comité ético y todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

Los pacientes con PTT se dividieron en 3 grupos:

- PTT aguda antes de RTX (n=3): pacientes con debut de los síntomas de PTT, asociados con una disminución significativa de la actividad de ADAMTS13, y presencia de Ac IgG anti-ADAMTS13.
- Pacientes con PTT, que habían alcanzado la remisión clínica (recuento de plaquetas >150 x 10⁹/L) tras RTX, al inicio de la repoblación periférica de

células B (n=5; la muestra de un paciente estaba disponible antes del inicio del tratamiento y en el momento de la repoblación).

- Pacientes con PTT en remisión (recuento de plaquetas $>150 \times 10^9/L$) tras la repoblación periférica de linfocitos B (n=12).

Criterios de exclusión

- Pacientes no respondedores al primer ciclo de RTX, esto es, que no consiguieran una reducción del DAS28 >1.2 puntos, o en los que no se objetivara una mejoría clínica y/o analítica.
- Pacientes con actividad inflamatoria persistente, que precisaran un segundo ciclo de RTX a los 6 meses del primero.
- Pérdida de seguimiento antes de la primera recaída tras tratamiento con RTX.
- Pacientes en los que no se haya objetivado aún el inicio de la repoblación periférica de linfocitos B tras el primer ciclo de RTX.
- Pacientes con AR con datos incompletos en cuanto a las determinaciones de linfocitos CD19+.
- Pacientes que hubieran recibido RTX por otras indicaciones concomitantes (ej: pacientes con diagnóstico de linfoma de células B tratado con RTX).
- Pacientes que presenten un síndrome de solapamiento con otra enfermedad autoinmune como LES, SS o miopatías inflamatorias, pues los resultados del estudio de BAFF y receptores podrían variar.

Variables recogidas

Principales:

- Determinación de linfocitos CD19+ por citometría de flujo en el laboratorio de referencia del hospital: esta determinación se realizaba cada 2-3 meses en la consulta especializada de AR y RTX , lo cual permitía calcular:
 - Tiempo entre la administración de RTX y el inicio de la repoblación periférica de linfocitos B.
 - Tiempo entre el inicio de la repoblación periférica y la recaída de la enfermedad. En base a este dato se clasifica a los pacientes en R-C y R-D.
- Tiempo entre la administración de RTX y la toma de muestras en pacientes con PTT en remisión tras RTX; se calcula en base a la fecha de la primera infusión del tratamiento.
- Análisis de las subpoblaciones de células B, utilizando según el estudio uno de estas 2 clasificaciones:
 - Clasificación IgD/CD38: divide las células en *naïve* transicionales, *naïve* maduras, memoria post-centro germinal, plasmoblastos, IgD- *resting memory* y IgD+ *resting memory*.
 - Clasificación IgD/CD27: divide las células en células *naïve*, dobles negativas, memoria pre y postswitch.

- Determinación de la expresión (porcentaje) de BAFF-R en pacientes con AR y PTT, y TACI y BCMA en pacientes con AR. Se decidió no estudiar TACI y BCMA en pacientes con PTT porque los estudios realizados en AR no aportaron datos relevantes.
- Determinación de los niveles séricos de BAFF en pacientes con AR y PTT.

Secundarias:

- Datos demográficos: edad, sexo.
- Años de enfermedad en pacientes con AR.
- Positividad del FR y los Ac anti-PCC en pacientes con AR, medidos en el laboratorio de referencia del hospital mediante una prueba de aglutinación en látex en caso del FR, y mediante un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) en caso de los Ac anti-PCC.
- Tratamientos previos y concomitantes de los pacientes con AR al inicio de la terapia con RTX.
 - o Corticoides.
 - o FAME (MTX u otros).
 - o Anti-TNF previos.
 - o CYC al inicio de la terapia con RTX (la CYC se utilizó inicialmente en los primeros pacientes que recibieron RTX, pero se eliminó posteriormente del protocolo de tratamiento).
- Número de ciclos de RTX recibidos.

- Determinación de la expresión (intensidad media de fluorescencia o MFI: mean fluorescent intensity) de BAFF-R en pacientes con AR y PTT, y TACI y BCMA en pacientes con AR.

Técnicas

Evaluación de la depleción de células B

Las muestras se recogen de forma rutinaria en consulta, y las células CD19+ se calculan mediante citometría de flujo en el laboratorio del hospital. El rango normal de células CD19+ utilizado en el laboratorio en UCL es de $0.03-0.40 \times 10^9$ /Litro.

- Se considera que la depleción de células B es adecuada cuando la determinación de células CD19+ es inferior a 5×10^6 / L.
- Se considera repoblación de células B cuando la determinación de células CD19+ es igual o superior a 5×10^6 / L o aumenta por encima del 0.5% del conteo total de linfocitos.

El siguiente esquema muestra la organización habitual en la consulta de AR y RTX, destacando la frecuencia de las consultas de revisión y los parámetros que se evalúan habitualmente.

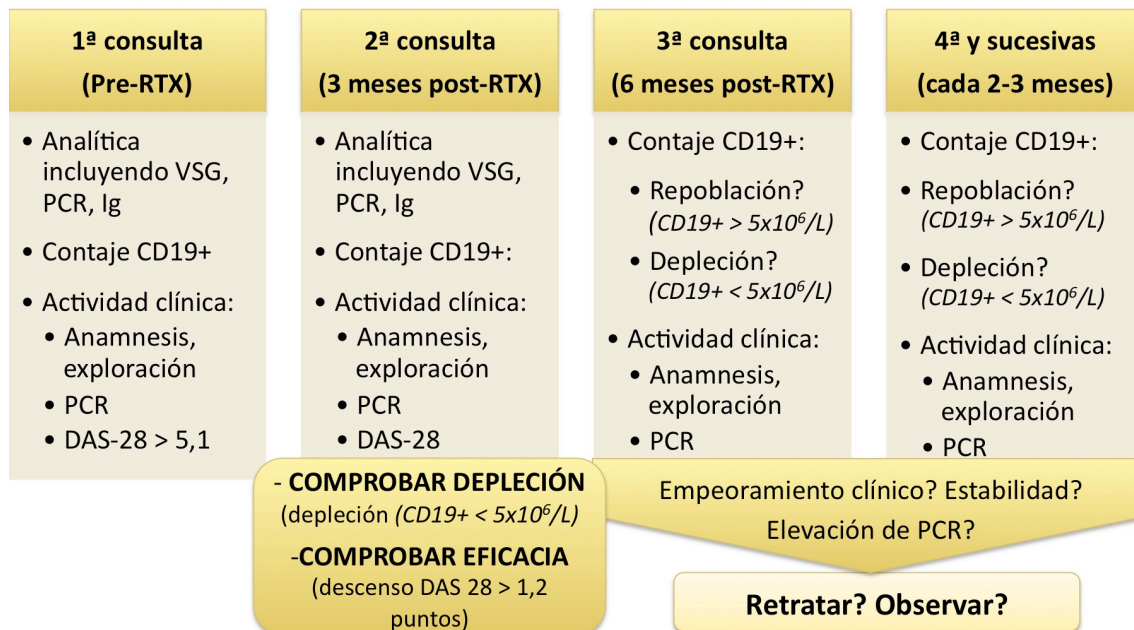


Figura 11: Esquema explicativo de la organización de la consulta de UCL.

La primera consulta incluye una valoración clínica y analítica global del paciente, con especial atención a los niveles de PCR, VSG e Ig. Se realiza un DAS-28, determinante para decidir si el paciente puede recibir el tratamiento (para poder recibir tratamiento biológico en Reino Unido, el paciente precisa tener una puntuación DAS-28 > 5,1). La segunda consulta, 3 meses después del tratamiento, sirve para comprobar la depleción completa de células B (determinada mediante un conteo de células $CD19 < 5 \times 10^6 / L$) y la eficacia del tratamiento (debe comprobarse un descenso de DAS-28 > 1,2 puntos). En la tercera consulta y sucesivas, cada 2-3 meses habitualmente, se comprueba el conteo de células $CD19+$ para ver si se ha iniciado la repoblación o bien el paciente continúa deplecionado, y se evalúa de nuevo la actividad clínica para decidir si el paciente debe recibir un nuevo ciclo de tratamiento, o continuar revisiones periódicas y re-tratar al inicio de la recaída clínica.

Aislamiento y tinción de células mononucleares en sangre periférica

Las células mononucleares en sangre periférica (PBMCs: *peripheral blood mononuclear cells*) son células sanguíneas caracterizadas por poseer un único núcleo redondo, como los monocitos, macrófagos y linfocitos. Se aíslan mediante un *gradiente de densidad por centrifugación sobre ficoll-hypaque* (*Ficoll-PaqueTM Plus*; GE Healthcare, Suecia). Los hematíes y granulocitos son más densos y pasan a través del gradiente, mientras que las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) quedan sobre el ficoll formando un anillo blanco que puede recuperarse de la interfase [185].

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite determinar tanto el número de células positivas para un marcador determinado como su intensidad de expresión; precisa que las células estén en suspensión para su análisis. Se usa, entre otras aplicaciones, para identificar poblaciones linfocitarias (inmunofenotipaje) mediante combinaciones de Ac específicos para Ag de superficie e intracelulares, marcados con diferentes fluorocromos. Los fluorocromos son sustancias que absorben energía a una longitud de onda determinada y emiten luz a una longitud de onda mayor que la de excitación. Pueden unirse directamente a Ac mono- o policlonales, así como a proteínas celulares (marcaje directo). También puede usarse un Ac monoclonal sin marcar, seguido de un segundo Ac reactivo frente al primero, y conjugado a un fluorocromo (marcaje indirecto).

Durante la recogida de datos en el citómetro, debe definirse la población de interés, ya que los linfocitos representan una población leucocitaria minoritaria, y la inclusión de células no linfocitarias puede falsear los datos. Para llevar a cabo la selección se utilizan 2 parámetros: *forward scatter* (tamaño) y *side scatter* (rugosidad). La combinación entre ambos permite distinguir entre linfocitos, granulocitos y monocitos (en ausencia de hematíes y plaquetas). Los linfocitos tienen el menor forward y side scatter, y los granulocitos tienen un side scatter muy elevado [185].

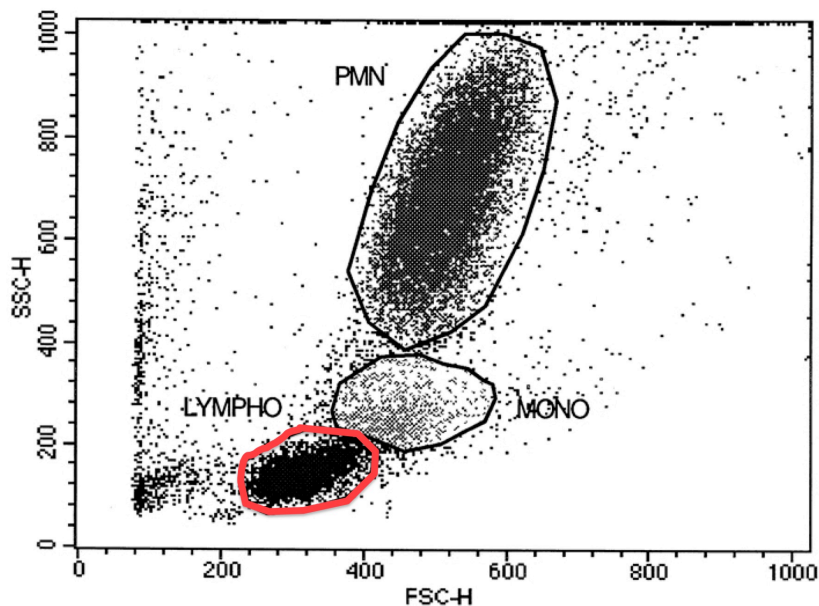


Figura 12: Selección de los distintos tipos celulares mediante forward (FSC-H) y side scatter (SSC-H).

Los linfocitos están redondeados por una línea roja. SSC-H: side scatter; FSC-H: forward scatter; Lympho: Linfocitos; Mono: Monocitos; PMN: granulocitos. *Modificado de Kutzsch et al "Hydrogen Peroxide Production in Leukocytes during Cerebral Hypoxia and Reoxygenation with 100% or 21% Oxygen in Newborn Piglets"*.

Preparación de las muestras

Se obtuvieron muestras de 10 ml de sangre heparinizada de pacientes y CS, con obtención de PBMCs tras centrifugación sobre ficoll-hypaque, como se ha descrito. Para el estudio de AR las células se tiñeron en el mismo día de su obtención. Para el estudio de PTT se aislaron y congelaron mediante nitrógeno líquido.

Las muestras de los pacientes se preparaban a la vez que la muestra de al menos un CS. Las PBMC se incubaron con los Ac conjugados correspondientes durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Posteriormente las células se lavaron y se fijaron con

paraformaldehído al 2% [186] durante 5 minutos, y se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta que se analizaron mediante citometría de flujo.

Estudio fenotípico

El inmunofenotipado de los PBMCs se realizó con combinaciones de Ac monoclonales murinos anti-humanos, conjugados con distintos fluorocromos: *fluorescein isothiocyanate (FITC)*, *phycoerythrin (PE)*, *peridinin chlorophyll protein cyanin (PerCP-Cy5.5)*, or *allophycocyanin (APC)*. Todos los Ac se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, USA), eBioscience (San Diego, USA) o R&D Systems (Minneapolis, USA).

Para el análisis de células B, se utilizaron combinaciones de Ac anti-CD19 PerCP-Cy5.5, anti-IgD-FITC y anti-CD27 o anti-CD38-APC para definir los subtipos de células B (CD19+). Se utilizaron 2 clasificaciones distintas en los dos estudios, según las subpoblaciones de células B que se pretendían estudiar.

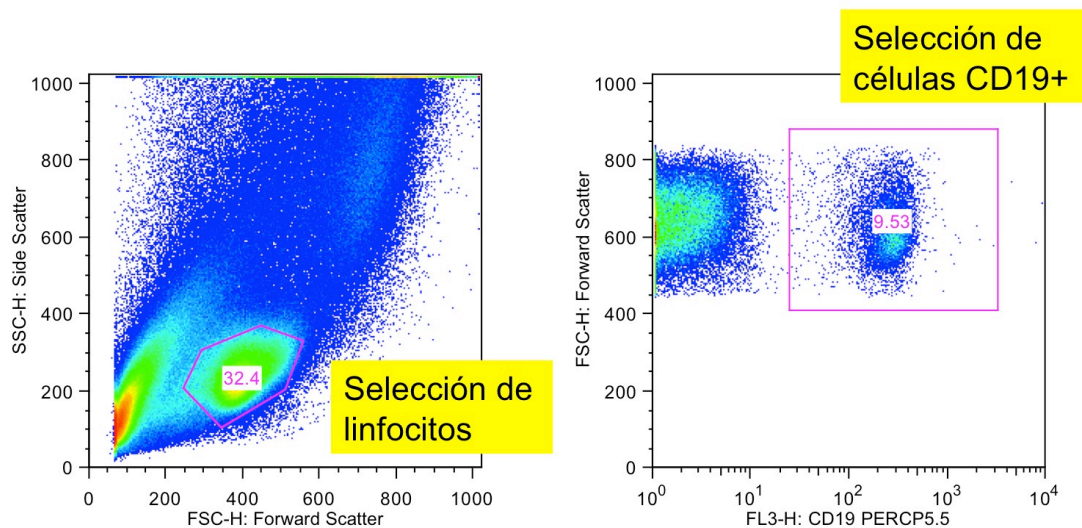


Figura 13: Selección inicial de la población de linfocitos, y seguidamente de la población de células B CD19+.

Para el estudio de AR, las subpoblaciones linfocitarias se definieron a partir de la expresión de IgD/CD38, tras seleccionar las células CD19+. Los subtipos celulares descritos son: *naïve* transicionales (IgD+CD38++), *naïve* maduras (IgD+CD38+), IgD- *resting memory* (IgD-CD38-), IgD+ *resting memory* (IgD+CD38-), memoria post-centro germinal (IgD-CD38+) y plasmoblastos (IgD-CD38++/+). Esta clasificación aporta la ventaja de poder estudiar la subpoblación de plasmoblastos, [16], células que juegan un papel importante en la recaída de la enfermedad en AR, por lo que su determinación en este estudio era interesante.

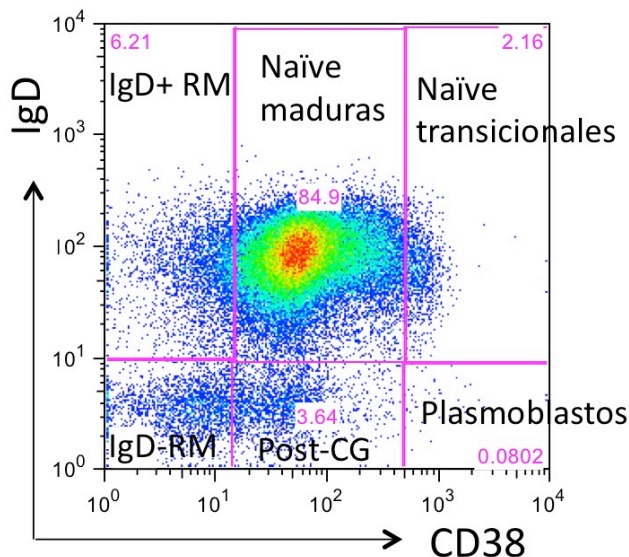


Figura 14: Subpoblaciones de células B según la expresión de IgD/CD38

Las subpoblaciones de células B identificadas son: *naïve* transicionales, *naïve* maduras, IgD- *resting memory* (IgD-RM), IgD+ *resting memory* (IgD+RM), post-centro germinal (post-CG) y plasmoblastos.

Para el estudio de PTT y el estudio comparativo con AR, las subpoblaciones linfocitarias se definieron en base a la expresión de IgD/CD27, tras seleccionar las células CD19+, identificando: células B *naïve* (IgD+CD27-), memoria pre-switch memory (IgD+CD27+), memoria post-switched (IgD-CD27+) y células B memoria dobles negativas (IgD-CD27-) [13, 187]. Se decidió utilizar esta clasificación en este estudio

por su mayor simplicidad respecto a la anterior, dado que no se pretendía valorar la subpoblación de plasmoblastos, pues se analizan pacientes con PTT en remisión, en los que los plasmoblastos no tendrían un papel importante.

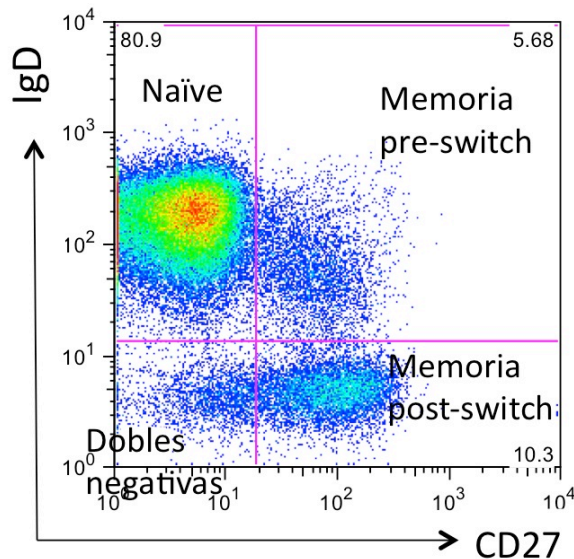


Figura 15: Subpoblaciones de células B según la expresión de IgD/CD27.

Las subpoblaciones de células B identificadas son: *naïve*, memoria *pre-switch*, memoria *post-switch* y células memoria dobles negativas (IgD-CD27-).

Estudio de la expresión de los receptores de BAFF

La expresión de los receptores de BAFF para cada subtipo celular CD19+ se analizó en el estudio de AR usando Ac anti-BAFF-R-PE (11C1), anti-TACI-biotin con Streptavidin PE (marcaje indirecto en este caso) y anti-BCMA-PE. Como se verá después, los resultados de TACI y BCMA no mostraron diferencias significativas en los subgrupos de pacientes con AR estudiados, por lo que se decidió no hacer esas determinaciones en el estudio de PTT, determinando únicamente BAFF-R en esos pacientes.

Mediante el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo puede calcularse la expresión de los receptores en los distintos subtipos celulares, tanto el

porcentaje (es decir, el número de células que presentan el receptor estudiado) como la intensidad media de fluorescencia (MFI) (es decir, el número de receptores que presenta cada célula). Aunque se han analizado ambos parámetros para cada receptor, el estudio se ha centrado en el análisis del porcentaje de la expresión de los distintos BBRs, pues hay menos variabilidad entre muestras en comparación con los resultados de la MFI. La determinación de MFI puede cambiar dependiendo de las condiciones experimentales y las fluctuaciones de los rayos láser del citómetro, según el día del análisis de la muestra.

Los siguientes son ejemplos de citometría de flujo de cada uno de los receptores:

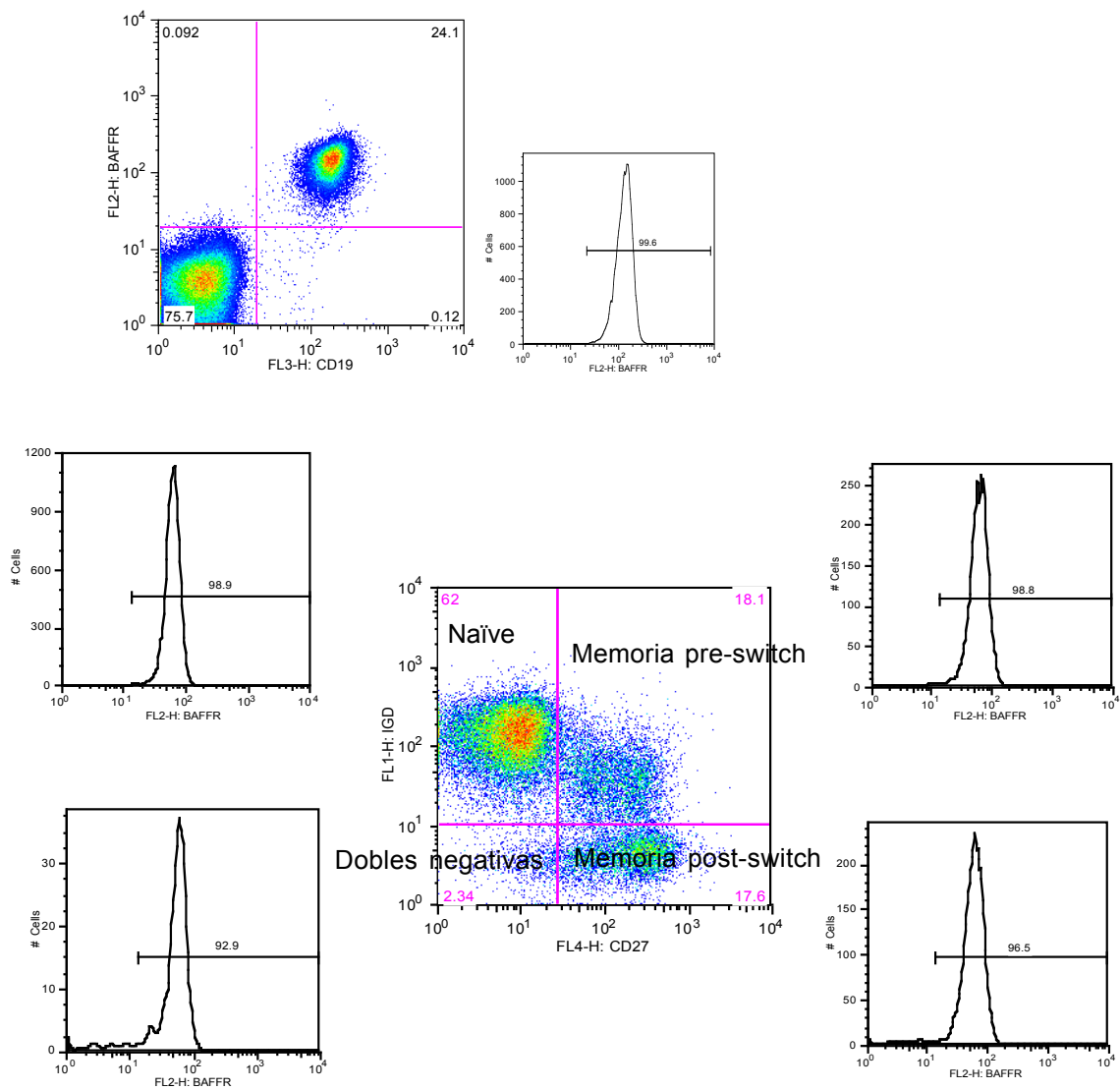


Figura 16: Estudio citométrico de BAFF-R en células CD19+.

El gráfico muestra la representación de BAFF-R/CD19 tras haber seleccionado la población de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de BAFF-R tras seleccionar la subpoblación CD19+. El ejemplo muestra cómo prácticamente todas las células CD19+ expresan BAFF-R. Posteriormente se realiza la determinación de BAFF-R en los subtipos de células B estudiados, como se muestra en los histogramas correspondientes a cada uno de ellos.

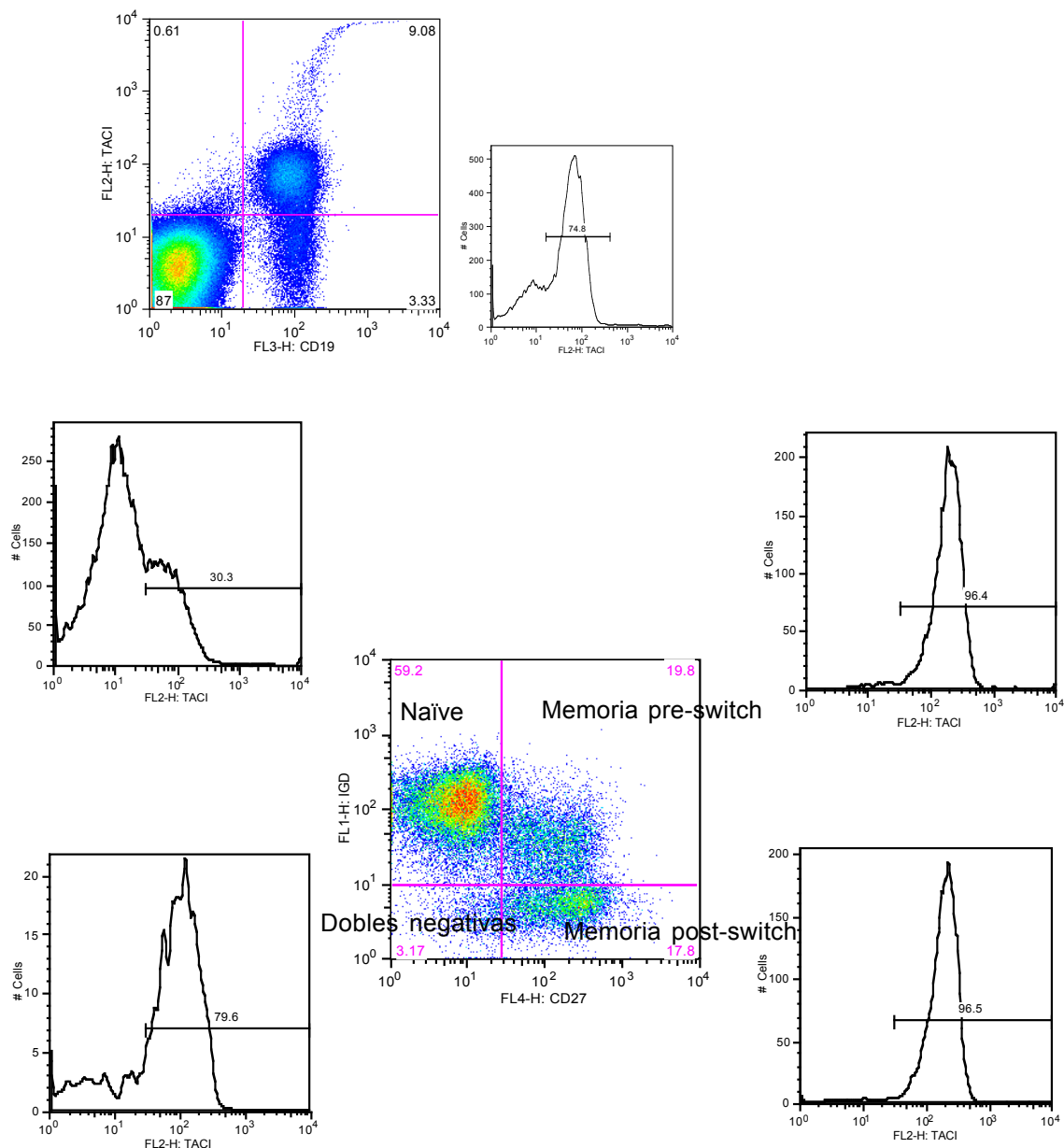


Figura 17: Estudio citométrico de TACI en células CD19+.

El ejemplo muestra el porcentaje de células CD19+ TACI+ tras haber seleccionado la población de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de TACI tras seleccionar la subpoblación CD19+. Posteriormente se realiza la determinación de TACI en los subtipos de células B estudiados, como se muestra en los histogramas correspondientes a cada uno de ellos; en el ejemplo se aprecia que las subpoblaciones de células B memoria expresan TACI en un porcentaje muy elevado, especialmente las células B memoria pre y post-switch.

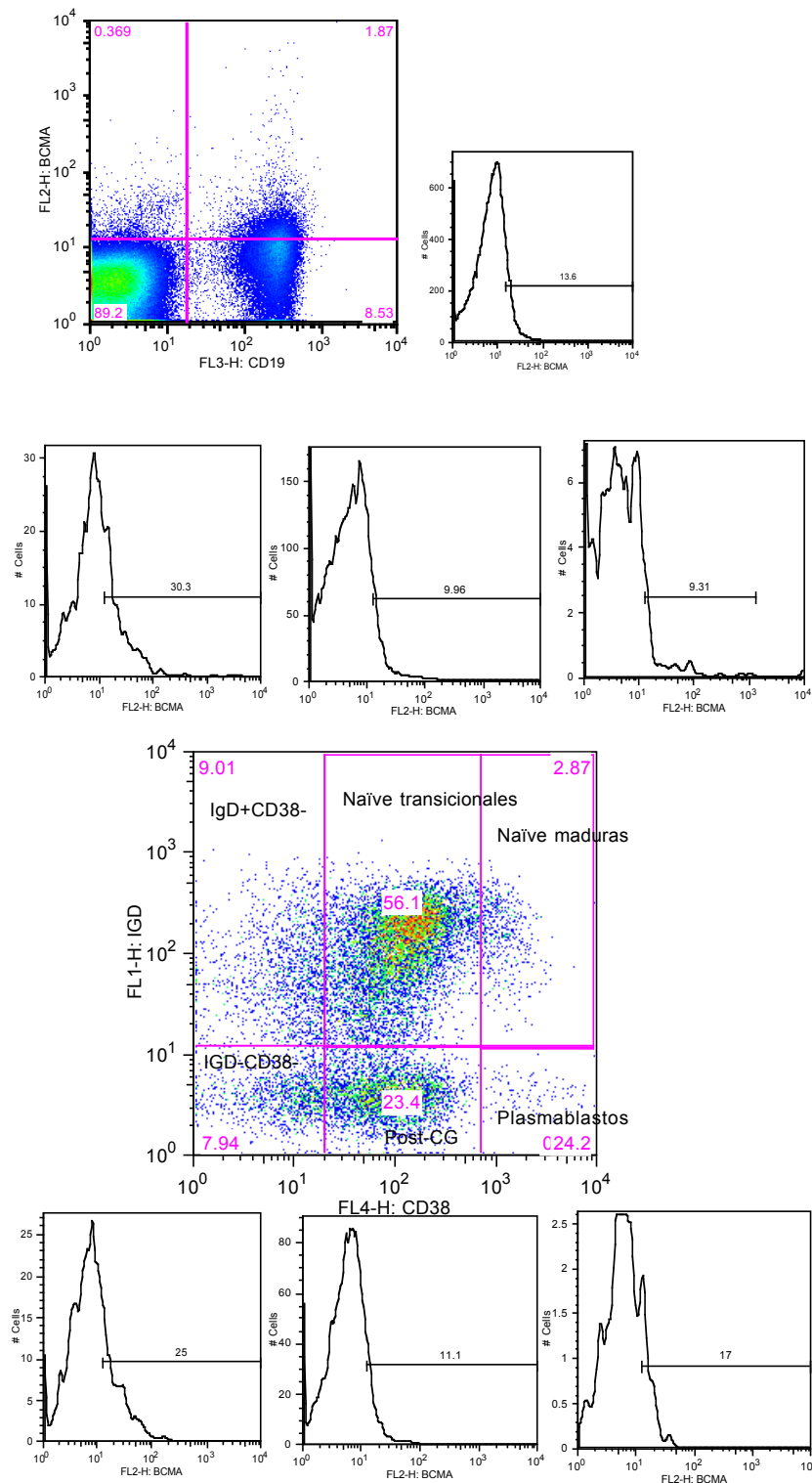


Figura 18: Estudio citométrico de BCMA en células CD19+.

El ejemplo muestra el porcentaje de células CD19+ BCMA+ tras haber seleccionado la población de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de BCMA tras seleccionar la subpoblación CD19+. Posteriormente se realiza la determinación de BCMA en los subtipos de células B estudiados, como se muestra en los histogramas correspondientes a cada uno de ellos; a priori los plasmoblastos deberían presentar el mayor porcentaje de células BCMA +, pero en este ejemplo el porcentaje de plasmoblastos es muy bajo, por lo que los resultados pueden verse artefactados.

Citómetro de flujo

Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro FACSCaliBur (FACS: fluorescence activated cell sorter) (Becton Dickinson, New Jersey, USA), con adquisición de 300000 eventos después de la selección de linfocitos.

Análisis de datos

Los datos se analizaron con el programa FlowJo (TreeStar, Stanford University, CA). El número absoluto de linfocitos CD19⁺ se calculó a partir del conteo de linfocitos del laboratorio del hospital.

Medición de BAFF

Los niveles de BAFF sérico se cuantificaron en CS y pacientes con AR y PTT, usando el kit: Human Quantikine® BAFF/BLyS Immunoassay ELISA kit (R&D Systems (Minneapolis, USA)).

Para el experimento de AR, la media \pm SD (n=36) proporcionada para ese lote era de 1.17 \pm 0.28 ng/ml (rango 0.67–2.45 ng/ml).

Para el experimento de PTT, la media \pm 3SD para suero normal proporcionada por el fabricante era de 1.17 \pm 0.84 ng/ml (2.01ng/ml). Se utilizó por tanto para describir el límite alto del rango normal.

Estadística

Se utilizaron los paquetes estadísticos: Graph Pad Prism 6, San Diego, USA, y SPSS Statistics software (SPSS IBM. Armonk, NY, EEUU). Se calculó la media, mediana y rango (mínimo y máximo) para todas las variables cuantitativas. Para las variables categóricas, como los tratamientos recibidos por cada pacientes, se hizo un recuento de su frecuencia en la muestra, y se calculó su porcentaje de ocurrencia. Se aplicó la prueba T de Student para la comparación realizada entre los tratamientos concomitantes de pacientes con AR y el tiempo de depleción de linfocitos B después del tratamiento con RTX.

Las frecuencias de subpoblaciones linfocitarias y expresión de los BBRs (porcentaje y MFI) en pacientes y CS se compararon con el test no paramétrico Mann-Whitney U test.

Se aplicó la correlación estadística (coeficiente de correlación de Pearson y su nivel de significación estadística) para estudiar las relaciones entre los niveles de BAFF sérico y la expresión (porcentaje y MFI) de los BBRs, el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX o entre la repoblación periférica de linfocitos B y la recaída clínica, y las relaciones con los parámetros de laboratorio.

RESULTADOS

Patrones de recaída en la cohorte de pacientes con AR de UCL tratada con RTX

271 pacientes recibieron RTX en el servicio de Reumatología de UCL entre los años 1998 y 2012, esto es, un total de 886 pacientes-año de seguimiento. Se administraron un total de 910 ciclos de tratamiento. Se seleccionaron 168 pacientes con buena respuesta a su primer ciclo de RTX, y que continuaron seguimiento al menos hasta la primera recaída, que se produjo entre 4 y 45 meses después del primer ciclo.

El 78 % de los pacientes (n: 132) eran mujeres. La edad media al inicio del tratamiento era de 56 años / mediana 58 años (rango 18-85 años) y la duración media de la enfermedad era de 15 años / mediana 12 años (rango 1-56 años).

La mayoría de los pacientes presentaban un FR + (154, 91 %) y Ac anti-PCC + (137, 81 %), según mediciones del laboratorio de referencia. La determinación de Ac anti-PCC no estaba disponible en 11 pacientes. La media y mediana de ciclos de RTX recibidos era de 4 (rango 1-11).

Los tratamientos previos recibidos incluían: Metotrexato (MTX) en 157 pacientes (93 %) y otros FAME sintéticos en 153 pacientes (91 %), incluyendo sulfasalazina, leflunomida, cloroquina, hidroxiclороquina, azatioprina, ciclosporina, sales de oro, CYC, D-penicilamina y clorambucil. El número medio de FAMEs recibidos incluyendo MTX era de 3 (mediana 3) (rango 0-6). En 110 pacientes (65 %)

se había utilizado tratamiento anti-TNF. El número medio de fármacos anti-TNF era de 1,24 (mediana 1) (rango 0-3). Respecto al tratamiento concomitante, 71 pacientes (42 %) tomaban MTX al inicio del tratamiento con RTX; 42 pacientes (25 %) estaban recibiendo otros FAME concomitantes; 47 pacientes (28 %) recibían corticoides orales; CYC se pautó en 25 pacientes (15 %), que se administró por vía intravenosa en 24 pacientes, y vía oral en un paciente. Las características de los pacientes se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 3: Datos demográficos de la cohorte de pacientes con AR de UCL y tratamientos recibidos

CARACTERÍSTICAS	n = 168
Edad media (rango)	56 años (18-85 años)
Nº mujeres (%)	132 (78 %)
Media de años de enfermedad (rango)	15 años (1-56 años)
FR +, nº (%)	154 (91 %)
Ac anti-PCC +, nº (%)	137 (81 %) *
Nº medio ciclos de RTX (rango)	4 (1-11 ciclos)
TRATAMIENTOS PREVIOS	
MTX, nº (%)	157 (93 %)
Otros FAME	153 (91 %)
Anti-TNF, nº (%), Nº medio y rango	110 (65 %) 1,24 (0-3 fármacos)
TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	
Corticoide oral, nº (%),	47 (28 %)
MTX nº (%)	71 (42 %)
otros FAME nº (%)	42 (25 %)
CYC nº (%)	25 (15 %)

* Ac Anti-PCC: no determinados en 11 pacientes.

Se confirmó la depleción completa de linfocitos B (determinación de células CD19+ $<5 \times 10^6$ / L) a los 3 meses del tratamiento con RTX en todos los pacientes incluidos en el estudio. El tiempo medio hasta la repoblación periférica (determinación de células CD19+ $>5 \times 10^6$ / L) fue 7,3 meses (rango 3-20 meses) y el tiempo medio hasta la recaída fue de 10,4 meses (rango 3-67 meses). En dos de los pacientes estudiados la enfermedad se ha mantenido en remisión hasta el momento de la recogida de datos, esto es, 28 y 38 meses después de su primer ciclo de RTX, y no han precisado un segundo ciclo de tratamiento por ahora.

Después se analizó el tiempo hasta la repoblación periférica, esto es, el momento en que las células B volvían a ser detectables en sangre periférica, y el tiempo hasta la recaída clínica. En base a estos conceptos, los pacientes se dividieron en dos patrones de recaída:

- R-C en 118 pacientes (70%), con un tiempo medio hasta la repoblación de 7,1 meses (rango 3-20 meses) y un tiempo medio hasta la recaída de 7,7 meses (rango 4-20 meses).
- R-D en 50 pacientes (30 %), con un tiempo medio hasta la repoblación de 7,8 meses (rango 3-20 meses) y un tiempo medio hasta la recaída de 17,4 meses (rango 6-67 meses).

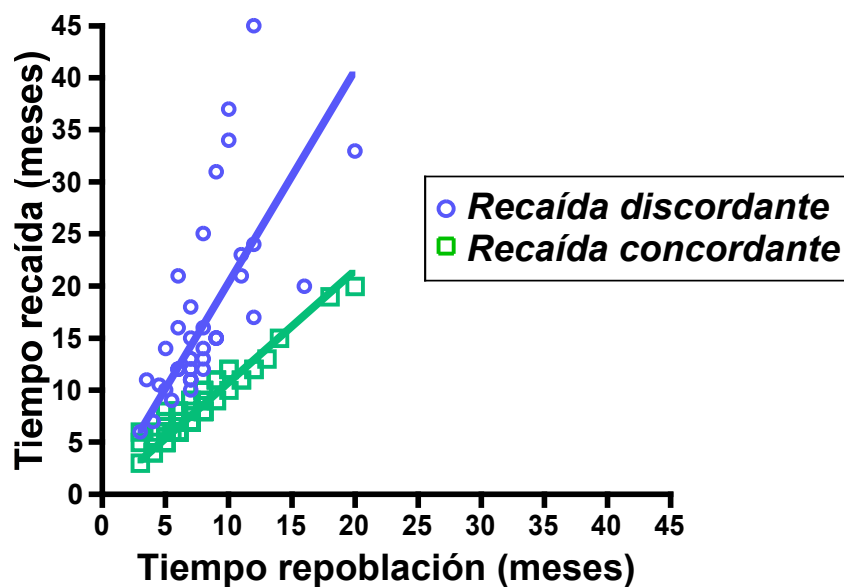


Figura 19: Pacientes con R-C y R-D.

El gráfico muestra la correlación entre el tiempo entre la administración de RTX y la repoblación periférica de células B, y el tiempo entre la administración de RTX y la recaída clínica. Los cuadrados y línea verde representan los pacientes con R-C, y los círculos y línea violeta representan a los pacientes con R-D.

No se observaron diferencias entre los pacientes que tomaban MTX u otros FAME y los que no recibían tratamiento concomitante. Sin embargo, en los pacientes tratados con CYC concomitante se evidenció una mayor duración de la depleción de linfocitos B y una duración mayor de la remisión en comparación con los pacientes que no la recibieron ($p < 0,05$).

Expresión de BBRs en subpoblaciones de células B en pacientes con AR en recaída tras depleción terapéutica de linfocitos B

Se seleccionaron 37 pacientes con AR, incluyendo 20 pacientes pre-RTX y 21 pacientes post-RTX, con recaída de la enfermedad después de la repoblación periférica; 4 pacientes se siguieron longitudinalmente, por lo que había muestras disponibles antes y después del tratamiento. Se dividieron a los pacientes post-RTX según la recaída presentada (R-C y R-D).

La edad media de los pacientes con AR de este estudio era 58 años (rango 27-80) y la duración media de la enfermedad era de 12,5 años (rango 1-33). Todos los pacientes tenían enfermedad erosiva. Había 5 pacientes de sexo masculino.

Las características de los pacientes seleccionados se resumen en las tablas 4 y 5. Tres pacientes pre-RTX eran seronegativos, tanto para FR como para Ac anti-PCC. Todos los pacientes estudiados post-RTX eran seropositivos para FR y/o Ac anti-PCC. La media de ciclos recibidos en pacientes en recaída clínica era de 2,6 (mediana 2 y rango 1-7).

Tabla 4: Características de los pacientes con AR pre-RTX

Paciente	Edad	Género	Años de enfermedad	FR	Ac anti-PCC
1	62	F	4	+	+
2	79	F	2	+	+
3	68	M	4	neg	+
4	68	F	3	+	+
5	72	M	1	+	+
6	54	F	17	+	neg
7	61	F	5	neg	+
8	31	F	8	+	+
9	49	F	16	neg	+
10	45	F	12	+	+
11	62	F	3	+	+
12	32	F	2	neg	neg
13	80	F	22	+	+
14	61	F	4	+	+
15	27	F	6	neg	+
16	68	F	4	+	+
17	59	F	3	+	+
18	60	F	4	neg	+
19	48	F	3	neg	neg
20	56	F	9	neg	neg

***Tabla 5: Características de los pacientes con AR en recaída clínica
después de RTX***

Paciente	Edad	Género	Años de enfermedad	FR	Ac anti-PCC	Nº ciclos
RECAÍDA CONCORDANTE						
11*	62	F	3	+	+	1
13*	80	F	22	+	+	1
14*	61	F	4	+	+	1
21	56	M	20	+	+	3
22	63	F	23	+	+	3
23	72	F	15	+	+	5
24	40	F	3	+	+	1
25	56	F	NA	+	+	3
26	71	F	13	+	neg	6
27	37	F	7	+	+	2
28	39	F	23	+	+	7
RECAÍDA DISCORDANTE						
10*	45	F	12	+	+	1
29	70	M	30	+	+	1
30	68	F	23	+	+	3
31	34	F	18	+	+	2
32	46	F	NA	+	+	3
33	67	F	21	+	+	2
34	77	F	33	+	+	4
35	59	F	31	+	+	2
36	54	M	30	neg	+	2
37	62	F	25	+	+	2

* Los pacientes 10, 11, 13 y 14 se analizaron antes y después del tratamiento con RTX.

1. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes en recaída clínica después de RTX

La figura muestra gráficos de citometría representativos, en este caso de una paciente con seguimiento longitudinal: antes de RTX, al inicio de la repoblación periférica de células B, 3 meses después de la repoblación (en ese momento no se le retrató porque su AR seguía en remisión) y 6 después de la repoblación, cuando recibió un segundo ciclo de RTX por reactivación de la enfermedad. Como se aprecia en los gráficos, la repoblación se inicia con un predominio de células B *naïve* transicionales, que progresivamente se convierten en células B maduras. Todos los pacientes que se siguieron longitudinalmente presentaban un estudio fenotípico similar.

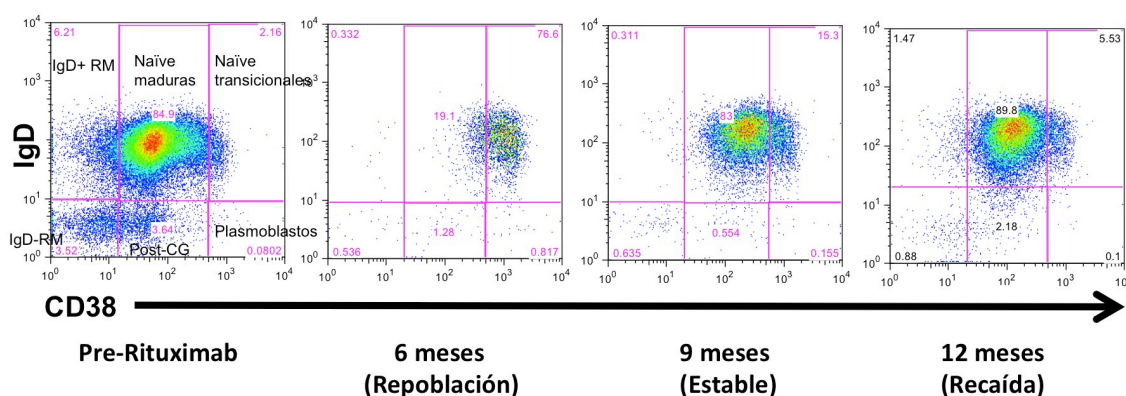


Figura 20: Ejemplo de un estudio citométrico de los subtipos de células B.

El estudio fenotípico previo al tratamiento con RTX muestra la distribución habitual de las células B (*naïve* transicionales, *naïve* maduras, IgD+ *resting memory* (IgD+ RM), IgD- *resting memory* (IgD- RM), post-CG y plasmoblastos). En el momento de la repoblación se observa un aumento de células B *naïve* transicionales. Posteriormente se observa que las células pasan a ser *naïve* maduras. Esta paciente estaba estable en el momento de la repoblación y cuando se revisó en consulta 3 meses después. Al año del tratamiento se produjo su recaída clínica (R-D en este caso).

En las figuras siguientes se muestra el análisis de subpoblaciones de linfocitos B en base a la expresión de IgD/CD38, en pacientes pre-RTX, y pacientes post-RTX con R-C y R-D. Los resultados se muestran en porcentaje y números absolutos. Se han

destacado las diferencias significativas encontradas en el análisis estadístico que compara a los pacientes con R-C y R-D. También se vieron diferencias significativas cuando se compararon estos pacientes con los CS o los pacientes pre-RTX, como se esperaría en el momento de la repoblación periférica de células B, pero no se han dibujado para evitar confusiones en los gráficos.

En los siguientes análisis se han comparado medianas. En pacientes con R-C se observó un mayor porcentaje de células B transicionales, que es estadísticamente significativo si se compara con los pacientes con R-D (24.7 %, rango 8.9-79.5 % vs 5.4 %, rango 0.6-9.2 %; $p < 0.001$). Los valores absolutos de células B transicionales también eran mayores en pacientes con R-C respecto a los pacientes con R-D, pero la comparación no fue estadísticamente significativa (10.5×10^6 células, rango 0.5-36 $\times 10^6$ vs 5.9×10^6 células, rango 0.1-19 $\times 10^6$).

Los pacientes con R-D presentaban mayores porcentajes y valores absolutos de células B *naïve* maduras en comparación con los pacientes con R-C (83.7 %, rango 57.6-91.9 % vs 47.6%, rango 3-86.7 %, $p < 0.01$ y 87.8×10^6 células, rango 7.2-331 $\times 10^6$ vs 6.4×10^6 células, rango 0.1-349.7 $\times 10^6$, $p < 0.05$).

Los porcentajes y valores absolutos de las células IgD+ *resting memory* fueron significativamente más altos en pacientes en R-D que en pacientes en R-C (3.2 %, rango 1-6.9 % vs 0.6 %, rango 0-2.1 %, $p < 0.01$; 3.2×10^6 células, rango 0.5-12.3 $\times 10^6$ vs 0.1×10^6 células, rango 0-8.7 $\times 10^6$, $p < 0.01$). La mediana de los valores absolutos de las células post-CG también fue significativamente más alta en pacientes con R-D respecto a pacientes en R-C (3.1×10^6 células, rango 1.7-18.3 $\times 10^6$, vs 1.1×10^6 células, rango

$0.1-4.4 \times 10^6$, $p < 0.01$). Los porcentajes y valores absolutos de las células B IgD- *resting memory* y plasmoblastos no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.

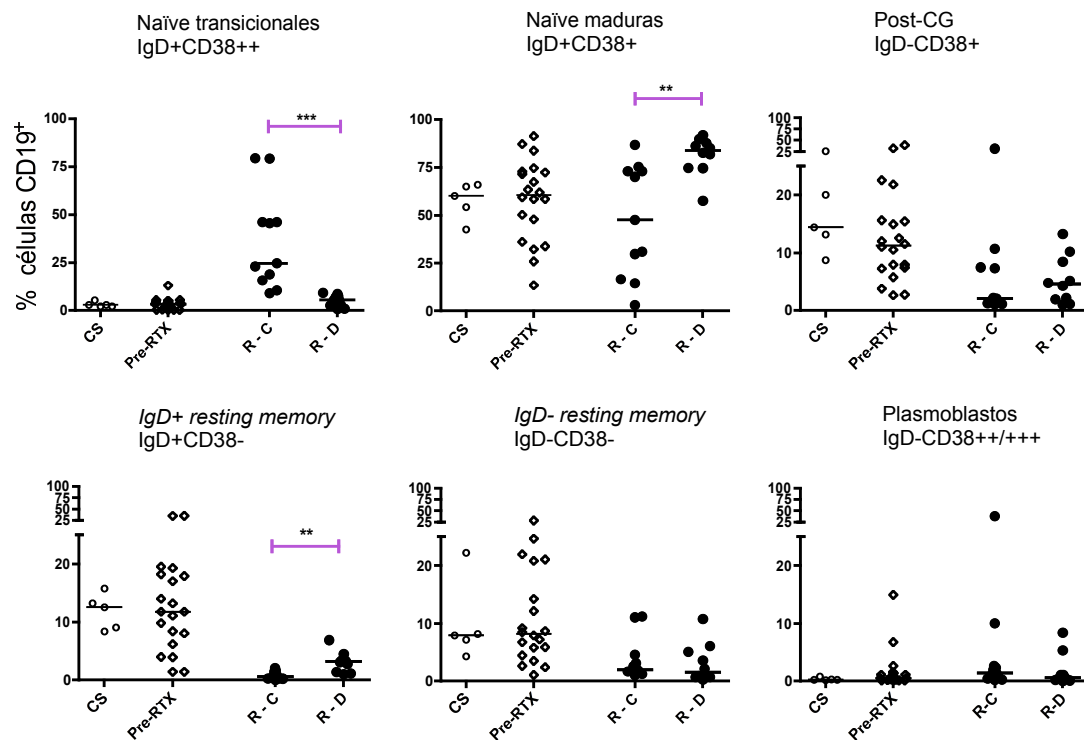


Figura 21: Porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B definidas en base a la expresión de IgD/CD38 en pacientes pre y post-RTX.

Los pacientes con una R-C tenían un mayor porcentaje (mediana) de células B *naïve* transicionales que los pacientes con R-D. Los pacientes con R-D mostraron un mayor porcentaje de células *naïve* maduras e IgD+ *resting memory* en comparación con los pacientes con R-C (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

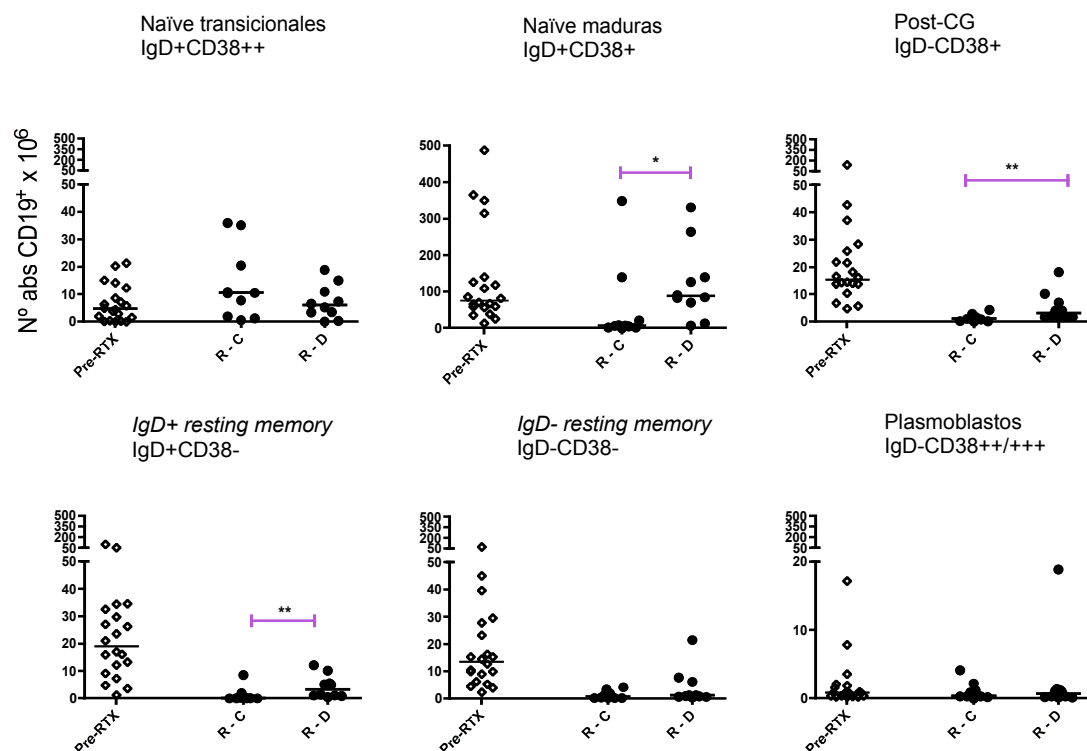


Figura 22: Valores absolutos de las subpoblaciones de linfocitos B definidas en base a la expresión de IgD/CD38 en pacientes pre y post-RTX en recaída clínica.

Los pacientes con una R-D mostraron mayores valores absolutos de células B *naïve* maduras, post-CG e IgD+ *resting memory* en comparación con los pacientes con R-C (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

2. ¿Hay alguna correlación entre las subpoblaciones de células B y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica en pacientes post-RTX?

El análisis de los fenotipos en pacientes que habían sufrido una recaída clínica menos de 7 meses después de la repoblación periférica de células B mostró una correlación directa entre el tiempo transcurrido desde la repoblación periférica hasta la recaída clínica en las células B *naïve* maduras ($r^2=0.46$, $p<0.01$) e IgD+*resting memory* ($r^2=0.34$ $p<0.05$), y una correlación inversa con las células B *naïve* transicionales

($r^2=0.43$, $p<0.01$). No se encontró ninguna correlación significativa cuando se comparó el tiempo transcurrido desde la repoblación periférica hasta la recaída clínica con los valores absolutos de los subtipos celulares (*datos no mostrados*).

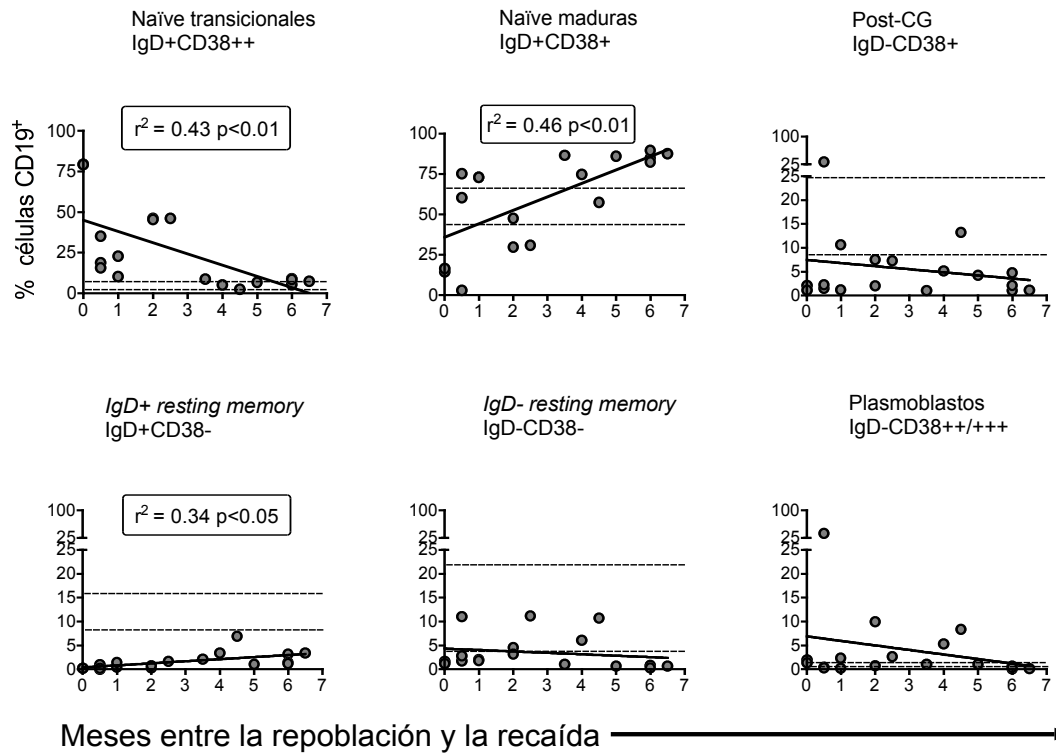


Figura 23: Correlación entre el porcentaje de subpoblaciones de células B y el tiempo entre la repoblación y la recaída clínica.

Se encontró una correlación directa significativa entre el tiempo (meses) entre la repoblación y la recaída clínica y el porcentaje de células *naïve* maduras e IgD+ *resting memory*, y una correlación inversamente significativa con el porcentaje de células *naïve* transicionales. Las áreas punteadas indican el valor normal de las subpoblaciones en CS.

3. Expresión de los receptores de BAFF en pacientes con AR pre-RTX y post-RTX en recaída

Se ha determinado la expresión de los 3 BBRs en las diferentes subpoblaciones de células B descritas, tanto en CS como en pacientes pre y post-RTX, con ambos patrones de recaída.

a) Expresión de BAFF-R

El análisis de la expresión (porcentaje) de BAFF-R no mostró diferencias significativas entre CS y pacientes pre-RTX. Sin embargo, se redujo significativamente en todos los pacientes post-RTX, con mayor reducción en pacientes con R-C, que fue estadísticamente significativa al compararla con los pacientes con R-D. En la siguiente figura se muestra el porcentaje de células BAFF-R⁺ en las subpoblaciones de células B estudiadas.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes post-RTX en comparación con los CS y pacientes pre-RTX en todas los subtipos de células B excepto en los plasmoblastos. Al comparar CS con pacientes con R-C de la enfermedad, las diferencias fueron más notables en células B *naïve* transicionales (95 %, rango 86.1-97.4 % vs 46.7 %, rango 14.5-78.4 %, $p<0.001$), *naïve* maduras (99.3 %, rango 98.6-99.4 % vs 61.3 %, rango 30.9-88.8 %, $p<0.001$) post-CG (97.9 %, rango 91.9-98.3 % vs 49.8 %, rango 18-66.3 %, $p<0.001$) e IgD- *resting memory* (94.8 %, rango 91.4-95.9 % vs 61.8 %, rango 9.1-78.6 %, $p<0.001$). Al comparar pacientes pre-RTX con pacientes con R-C de la enfermedad, las diferencias más evidentes se vieron

en células *naïve* transicionales (95.7 %, rango 35.3-100 % vs 46.7 %, rango 14.5-78.4 %, $p<0.001$) *naïve* maduras (99 %, rango 79.2-100 % vs 61.3 %, rango 30.9-88.8 %, $p<0.001$), post-CG (98 %, rango 80.8-99.8 % vs 49.8 %, rango 18-66.3 %, $p<0.001$) e IgD- *resting memory* (98.4 %, rango 66.7-100 % vs 61.8 %, rango 9.1-78.6 %, $p<0.001$).

Asimismo se observaron diferencias significativas cuando se compararon CS o pacientes pre-RTX con pacientes con R-D de la enfermedad. Al comparar CS con pacientes con R-D de la enfermedad, las diferencias más importantes se encontraron en células *naïve* maduras (99.3 %, rango 98.6-99.4 % vs 95.1 %, rango 74.9-98.8 %, $p<0.01$) y post-CG (97.9 %, rango 91.9-98.3 % vs 85.8 %, rango 50-97 %, $p<0.01$). Al comparar pacientes pre-RTX y con R-D de la enfermedad, destacan las diferencias en células post-CG (98 %, rango 80.8-99.8 % vs 85.8 %, rango 50-97 %, $p<0.01$), IgD+ *resting memory* (96.9 %, rango 72.5-100 % vs 88.4 %, rango 61-96.8 %, $p<0.01$) e IgD- *resting memory* (98.4 %, rango 66.7-100 % vs 92.2 %, rango 43.8-97.3 %, $p<0.01$).

Finalmente se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos de pacientes post-RTX, con un aumento del porcentaje de células BAFF-R+ en pacientes con R-D en las subpoblaciones: *naïve* transicionales (86 %, rango 44-93.9 % vs 46.7 %, rango 14.5-78.4 %, $p<0.01$), *naïve* maduras (95.1 %, rango 74.9-98.8 % vs 61.3 %, rango 30.9-88.8 %, $p<0.001$), post-CG (85.8 %, rango 50-97 % vs 49.8 %, rango 18-66.3 %, $p<0.001$) y la subpoblación IgD- *resting memory* (92.2 %, rango 43.8-97.3 % vs 61.8 %, rango 9.1-78.6 %, $p<0.05$).

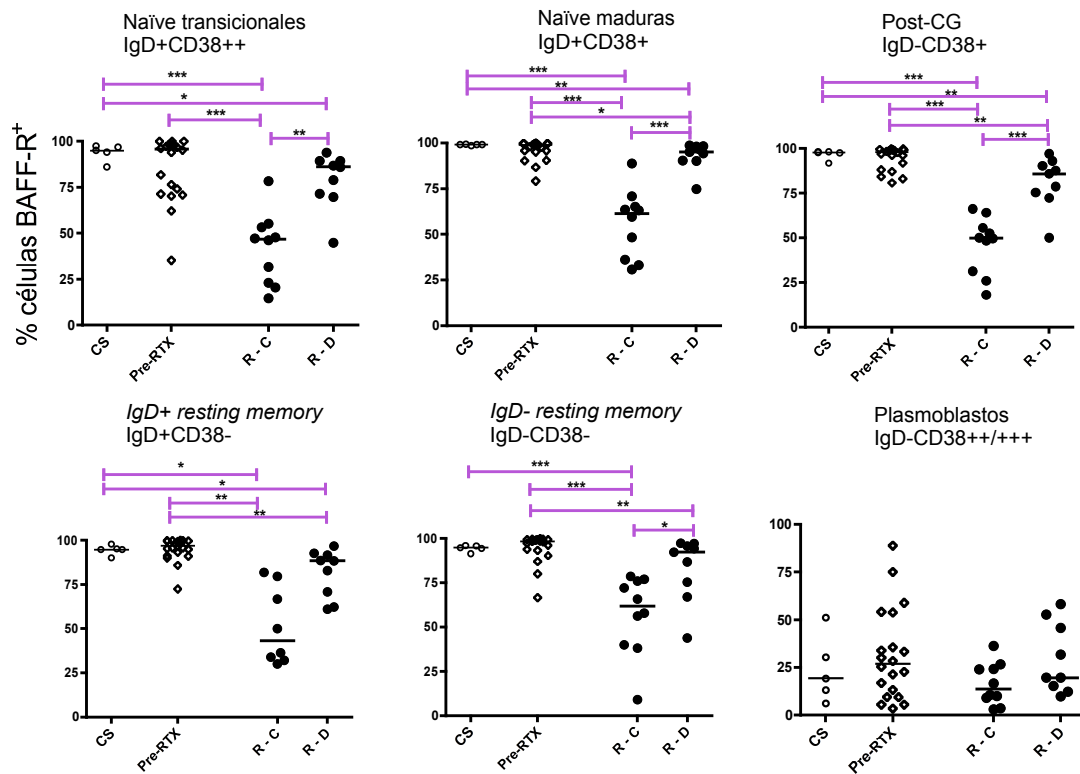


Figura 24: Porcentaje de células B BAFF-R+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

Se observaron diferencias significativas en todas las subpoblaciones de células B al comparar pacientes post-RTX (ambos patrones de recaída) con CS y pacientes pre-RTX. También se vieron diferencias significativas entre los pacientes con R-C y R-D en células *naïve* transicionales ($p < 0.01$), *naïve* maduras y post-CG ($p < 0.001$) y la población *IgD- memory resting* ($p < 0.05$) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

La MFI de BAFF-R estaba significativamente reducida en pacientes post-RTX en todas las subpoblaciones de células B, en comparación con los pacientes pre-RTX y los CS. Al comparar CS con pacientes con R-C de la enfermedad, destacan las diferencias en células *naïve* transicionales (50.6 MFI, rango 49.1-80.1 vs 16.1 MFI, rango 13-20, $p < 0.001$), *naïve* maduras (63.1 MFI, rango 58.1-96.5 vs 17.2 MFI, rango 13.7-47.6, $p < 0.001$), post-CG (78.6 MFI, rango 59.5-96.8 vs 17.3 MFI, rango 14.2-22.5, $p < 0.001$), *IgD- memory resting* (63 MFI, rango 46.4-80.7 vs 16.2 MFI, rango 12.4-21.6, $p < 0.001$) y plasmoblastos (38.2 MFI, rango 22-54 vs 13.3 MFI, rango 10.4-21.7, $p < 0.001$). Al comparar pacientes pre-RTX y con R-C de la enfermedad, la mayor

significación estadística se ve en células *naïve* transicionales (43.8 MFI, rango 14.1-135 vs 16.1 MFI, rango 13-20, $p<0.001$), *naïve* maduras (51.6 MFI, rango 16.1-154 vs 17.2 MFI, rango 13.7-47.6, $p<0.001$), post-CG (55.1 MFI, rango 14.8-179 vs 17.3 MFI, rango 14.2-22.5, $p<0.001$), e IgD+ *memory resting* (47.4 MFI, rango 15.7-131 vs 20.9 MFI, rango 14.7-37.6, $p<0.001$).

Al comparar CS con pacientes con R-D, se encontraron mayores diferencias en la MFI de BAFF-R en células *naïve* transicionales (50.6 MFI, rango 49.1-80.1 vs 29.1 MFI, rango 19.1-43.8, $p<0.001$), *naïve* maduras (63.1 MFI, rango 58.1-96.5 vs 30.7 MFI, rango 20.5-44.8, $p<0.001$), post-CG (78.6 MFI, rango 59.5-96.8 vs 33.4 MFI, rango 17.5-51.7, $p<0.001$) e IgD+ *memory resting* (61.1 MFI, rango 50.1-79.7 vs 30.2 MFI, rango 20.9-42, $p<0.001$). Al comparar pacientes pre-RTX y con R-D de la enfermedad, las diferencias más notables se vieron en células *naïve* maduras (51.6 MFI, rango 16.1-154 vs 30.7 MFI, rango 20.5-44.8, $p<0.01$), IgD+ *memory resting* (47.4 MFI, rango 15.7-131 vs 30.2 MFI, rango 20.9-42, $p<0.01$) y plasmoblastos (33.9 MFI, rango 14.1-106 vs 19.9 MFI, rango 13.7-28.2, $p<0.01$).

La MFI de BAFF-R también estaba significativamente reducida en pacientes con una R-C en comparación con pacientes con R-D, especialmente en células B *naïve* transicionales (16.1 MFI, rango 13-20 vs 29.1 MFI, rango 19.1-43.8, $p<0.001$), post-CG (17.3 MFI, rango 14.2-22.5 vs 17.3 MFI, rango 14.2-22.5, $p<0.001$), IgD-*resting memory* (16.2 MFI, rango 12.4-21.6 vs 36.6 MFI, rango 17.7-52.8, $p<0.001$) y plasmoblastos (13.3 MFI, rango 10.4-21.7 vs 19.9 MFI, rango 13.7-28.2, $p<0.001$).

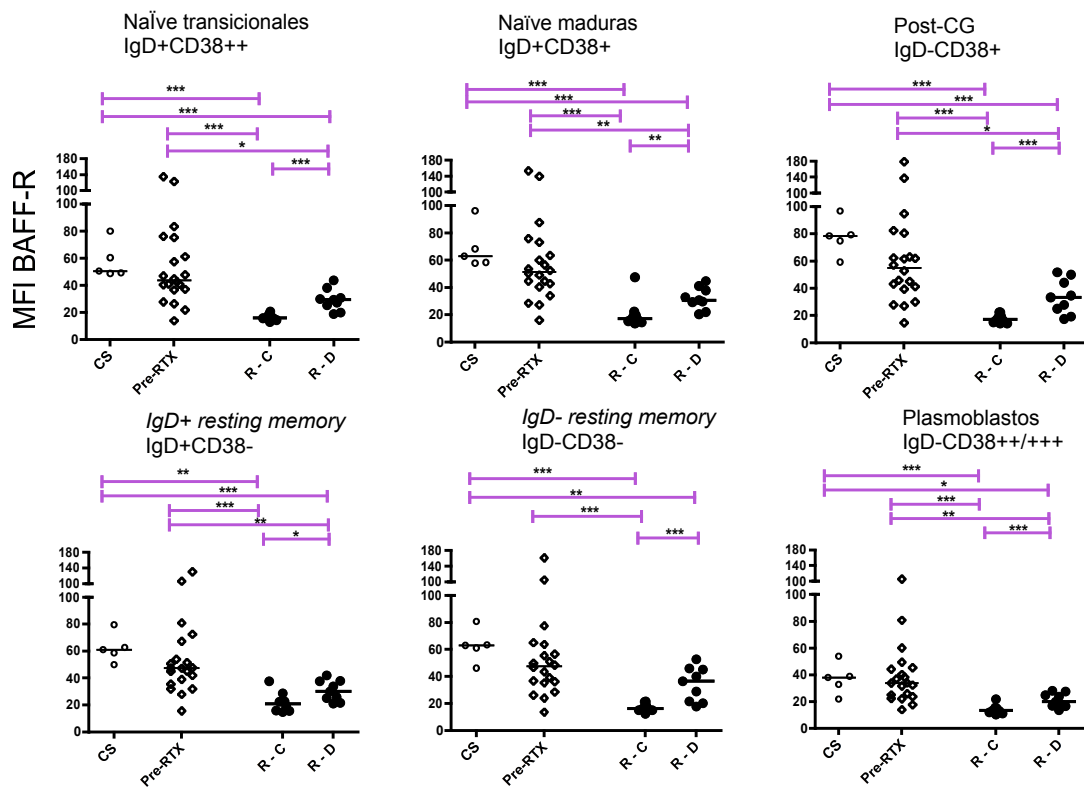


Figura 25: MFI de BAFF-R en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

Se muestra una reducción significativa de la MFI en todas las subpoblaciones de células en ambos grupos de pacientes post-RTX en recaída clínica en comparación con los CS y los pacientes pre-RTX. También se vio una reducción significativa de la MFI en pacientes con R-C respecto a los pacientes con R-D, $p < 0.001$ en células B *naïve* transicionales, post-CG, IgD-*resting memory* y plasmoblastos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

La siguiente figura muestra gráficos de citometría de una paciente seguida antes y después del tratamiento. La repoblación periférica de linfocitos B se inició a los 6 meses de su primer ciclo de RTX, pero la enfermedad se mantuvo estable hasta 3 meses después, lo cual permitió seguir la evolución de la expresión de BAFF-R. El porcentaje y MFI de BAFF-R era más bajo al inicio de la repoblación, pero aumentó progresivamente durante los meses siguientes. Los resultados fueron similares en otros pacientes que se siguieron longitudinalmente y no recayeron en el momento de la repoblación de células B.

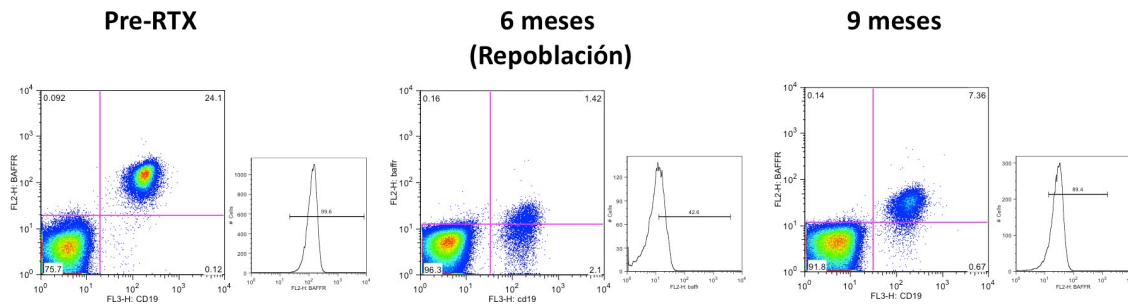


Figura 26: Estudio citométrico de la expresión de BAFF-R en un paciente pre y post-RTX.

El gráfico muestra la representación de BAFF-R/CD19 después de haber seleccionado la población de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de BAFF-R después de seleccionar la subpoblación CD19+. En este ejemplo se muestra un primer gráfico antes del tratamiento, comprobando que la práctica totalidad de los linfocitos CD19+ expresan BAFF-R. En el momento de la repoblación, a los 6 meses de haber recibido el tratamiento, la expresión de BAFF-R se reduce considerablemente. La paciente recayó 3 meses después, permitiendo un seguimiento más prolongado, y así objetivando un aumento de la expresión de BAFF-R 9 meses después de haber recibido RTX.

b) Expresión de TACI

La siguiente figura muestra que las subpoblaciones de células *naïve* (tanto transicionales como maduras) y los plasmoblastos presentaban un porcentaje de células B TACI+ similar en todos los subgrupos estudiados. Los análisis de los subtipos de linfocitos B memoria mostraron diferencias significativas entre los CS y los subgrupos de pacientes. El porcentaje de células post-CG TACI+ estaba significativamente reducido en todos los grupos de pacientes en comparación con los CS: 90.1 %, rango 85.1-93.3 % vs 73.8 %, rango 36.6-93.9 %, $p < 0.05$ al comparar CS con pacientes pre-RTX; 90.1 %, rango 85.1-93.3 % vs 62.7 %, rango 41.8-88.3 %, $p < 0.01$ en la comparación entre CS y pacientes con R-C, y 90.1 %, rango 85.1-93.3 % vs 63.9 %, rango 43.3-84.9 %, $p < 0.01$ al comparar CS y pacientes con R-D.

El porcentaje de células que expresan TACI también estaba reducido en las células IgD-*memory resting* en ambos grupos post-RTX en comparación con los CS: 93 %, rango 90.9-96.5 % vs 76.2 %, rango 43.4-95.8 %, $p < 0.05$ para la comparación entre

CS y pacientes con R-C, y 93 %, rango 90.9-96.5 % vs 73 %, rango 51.9-94.2 %, $p < 0.05$ para la comparación entre CS y pacientes con R-D. También estaba reducido en células B IgD+*resting memory* en pacientes con una R-D en comparación con los CS (49.3 %, rango 28.3-92.6 % vs 82.3 %, rango 59.3-94.8 %, $p < 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células que expresan TACI entre ambos grupos de pacientes post-RTX en ninguna de las subpoblaciones linfocitarias.

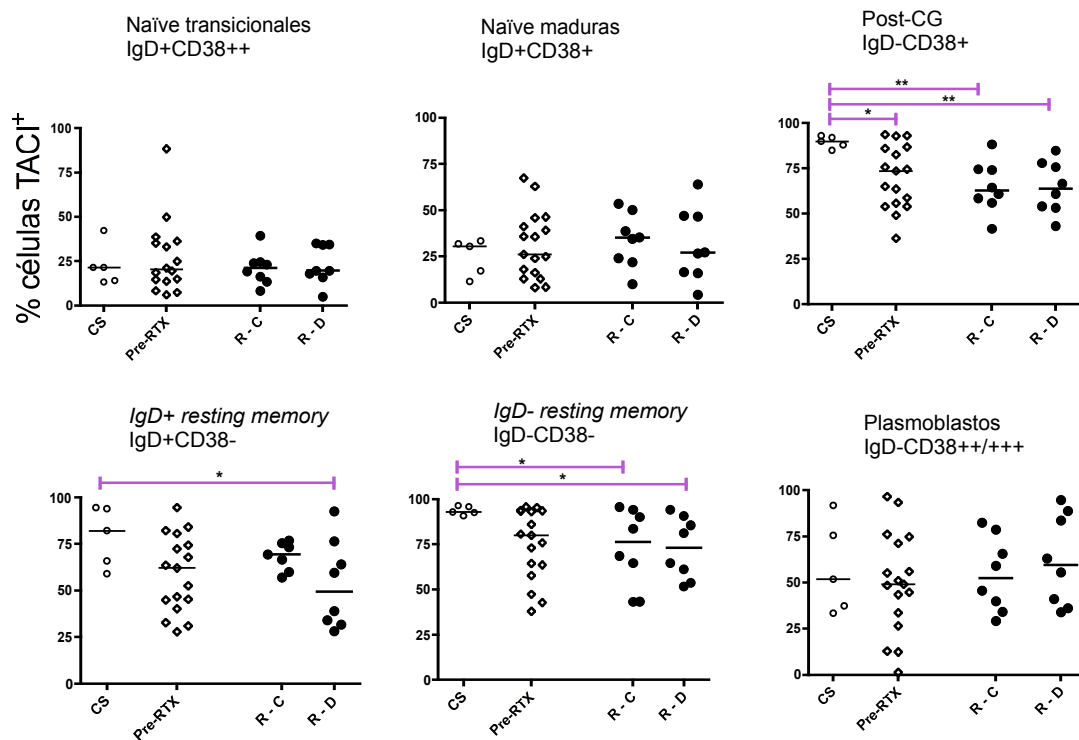


Figura 27: Porcentaje de células B TACI+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

Se observaron diferencias significativas entre los CS y los pacientes con AR, especialmente en la subpoblación de células post-CG, con una reducción significativa en el porcentaje de células TACI+ en todos los subgrupos con AR respecto a los CS (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

La MFI de TACI no fue diferente entre CS y ninguno de los subgrupos de pacientes, a excepción de la población IgD+ *memory resting*, con menor MFI en pacientes con R-C de la enfermedad en comparación con los CS (37.6 MFI, rango 21.9-98.8 vs 124 MFI, rango 89.5-233, $p < 0.01$).

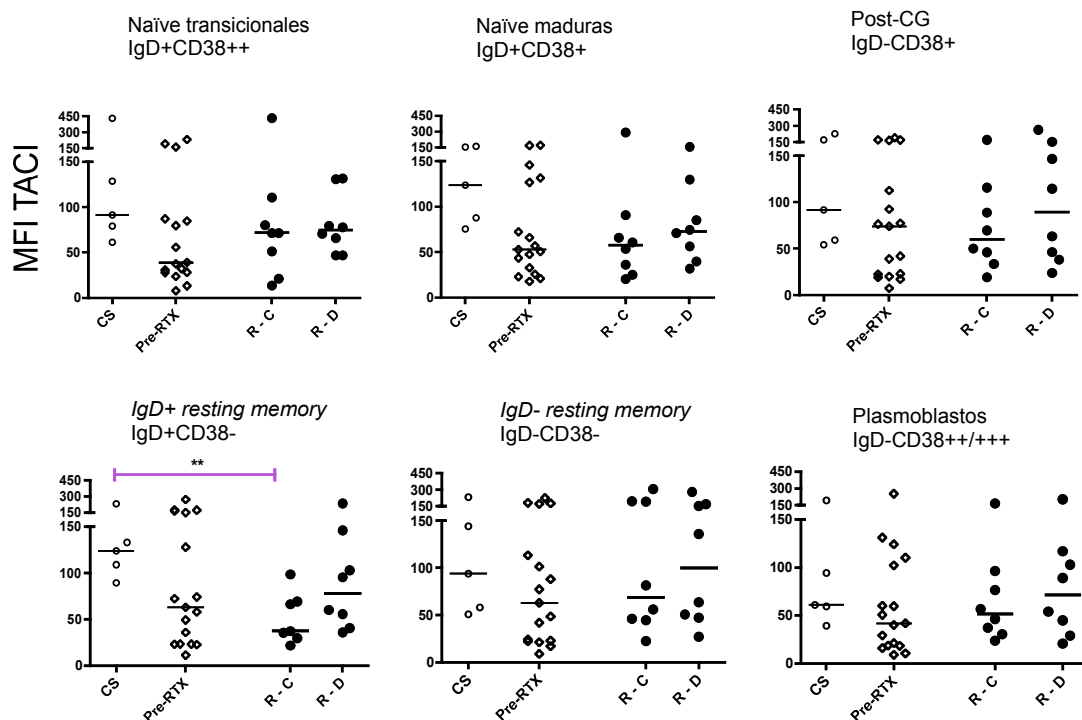


Figura 28: MFI de TACI en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

No se vieron diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones de células B, salvo una reducción significativa de la MFI de TACI en células IgD+ *resting memory* en pacientes con R-C en comparación con controles sanos (* $P < 0.05$).

La siguiente figura corresponde a una paciente con un elevado porcentaje de células B memoria antes del tratamiento y en el momento de la repoblación periférica, y por tanto un mayor porcentaje de células B TACI+.

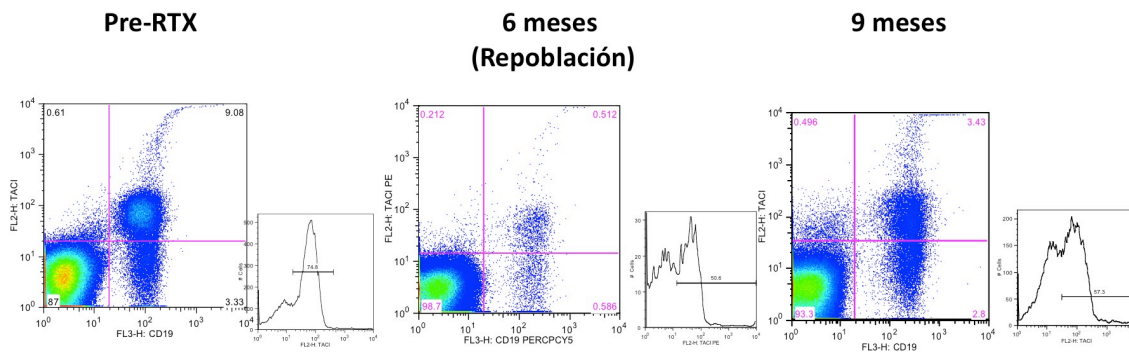


Figura 29: Estudio citométrico de la expresión de TACI en un paciente pre y post-RTX.

El gráfico muestra la representación de TACI/CD19 después de haber seleccionado la subpoblación de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de TACI después de seleccionar la población CD19+. En este ejemplo se muestra un primer gráfico antes del tratamiento. Un segundo gráfico representa el momento de la repoblación periférica de linfocitos B, con un porcentaje de células TACI+ muy elevado pues esta paciente tenía un porcentaje elevado de células B memoria durante la repoblación. El tercer gráfico representa la evolución de la expresión de TACI 3 meses después de la repoblación.

c) Expresión de BCMA

La siguiente figura muestra que el porcentaje de células B BCMA+ en las distintas subpoblaciones fue similar, incluyendo los plasmoblastos. Solamente se objetivó una reducción significativa del porcentaje de células B BCMA + en las células IgD-*resting memory* en pacientes con R-C, en comparación con los pacientes pre-RTX (11.7 %, rango 0-21.4 % vs 26.7, rango 4.9-39.1 %, $p < 0.01$) y en las IgD+*resting memory* en pacientes con R-D comparado con los pacientes pre-RTX (22.6 %, rango 1.6-38.2 %, vs 35.3 %, rango 11.5-55 %, $p < 0.05$). El porcentaje de plasmoblastos que expresan BCMA es mayor en ambos grupos post-RTX que en el momento de la recaída de la enfermedad, en comparación con CS y pacientes pre-RTX, pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

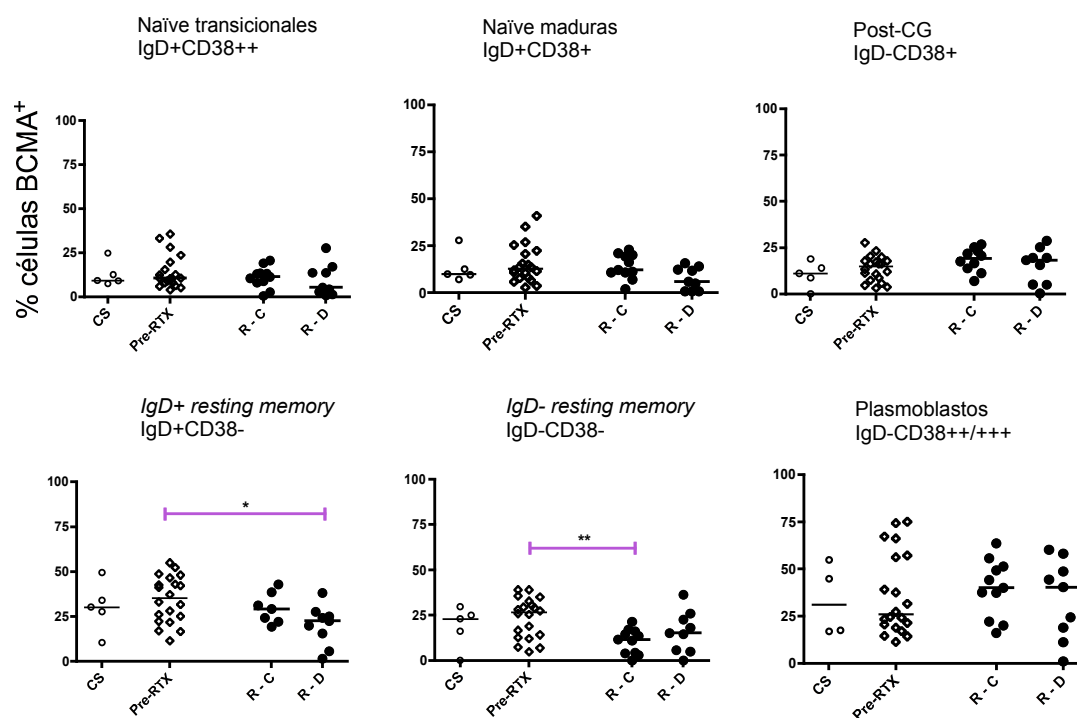


Figura 30: Porcentaje de células B BCMA+ en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

No se observaron diferencias significativas entre los subgrupos estudiados, a excepción de una reducción significativa del porcentaje de células B BCMA + en las células IgD-*resting memory* en pacientes con R-C, en comparación con los pacientes pre-RTX y en las IgD+*resting memory* en pacientes con R-D comparado con los pacientes pre-RTX (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

La MFI de BCMA no fue diferente entre los subgrupos de pacientes, a excepción de la subpoblación IgD-*memory resting*, con menor MFI de BCMA en los pacientes con una R-C en comparación con pacientes pre-RTX (23.2 MFI, rango 16.2-21.5 vs 41.5 MFI, rango 12.8-79.4, $p < 0.01$).

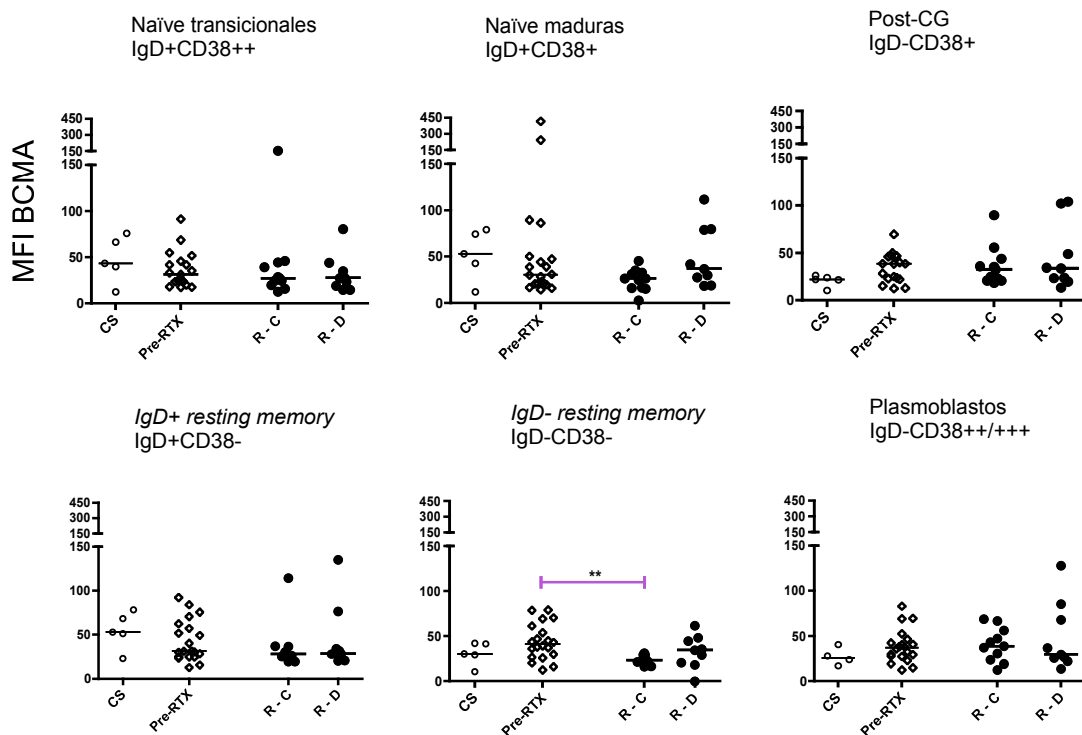


Figura 31: MFI de BCMA en CS, pacientes pre-RTX y post-RTX en recaída clínica.

La MFI de BCMA no fue diferente entre los subgrupos estudiados, excepto en células IgD-memory resting, con menor MFI en pacientes con R-C en comparación con pacientes pre-RTX (**P<0.01).

La siguiente figura muestra un gráfico de citometría de flujo en una paciente en remisión a los 3 meses de la repoblación periférica de células B.

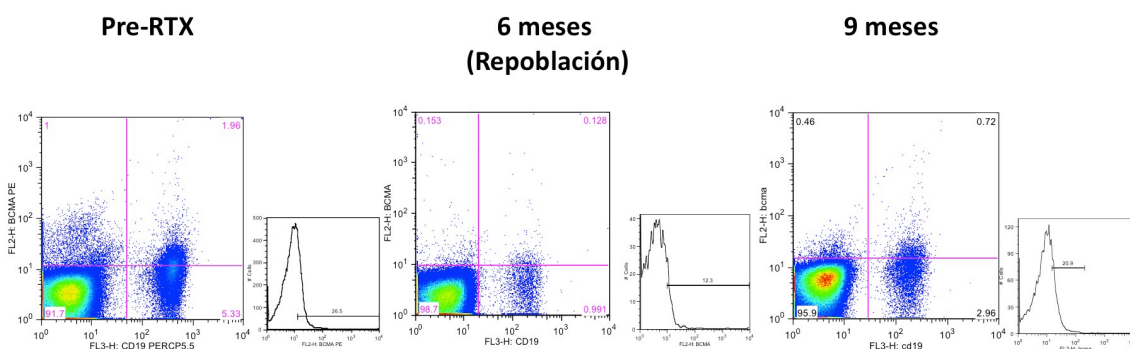


Figura 32: Estudio citométrico de la expresión de BCMA en un paciente pre y post-RTX.

El gráfico muestra la representación de BCMA/CD19 después de haber seleccionado la subpoblación de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de BCMA después de seleccionar la población CD19+. En este ejemplo se muestra un primer gráfico antes del tratamiento, un segundo gráfico en el momento de la repoblación periférica de células B, y un tercer gráfico 3 meses después del inicio de la repoblación.

5. ¿Hay alguna correlación entre la expresión de los BBRs y el tiempo entre la repoblación de células B y la recaída clínica en pacientes con AR tratados con terapia de depleción de linfocitos B?

Los gráficos muestran varias correlaciones significativas entre el porcentaje de expresión de BAFF-R y el tiempo entre la repoblación periférica de linfocitos B y la recaída clínica, tras seleccionar pacientes con recaída < 7 meses desde la repoblación periférica. El porcentaje de células BAFF-R+ mostraba una correlación directa con el tiempo desde la repoblación en células *naïve* transicionales ($r^2=0.38$, $p<0.01$), *naïve* maduras ($r^2=0.43$, $p<0.01$) y post-CG ($r^2=0.43$, $p<0.01$).

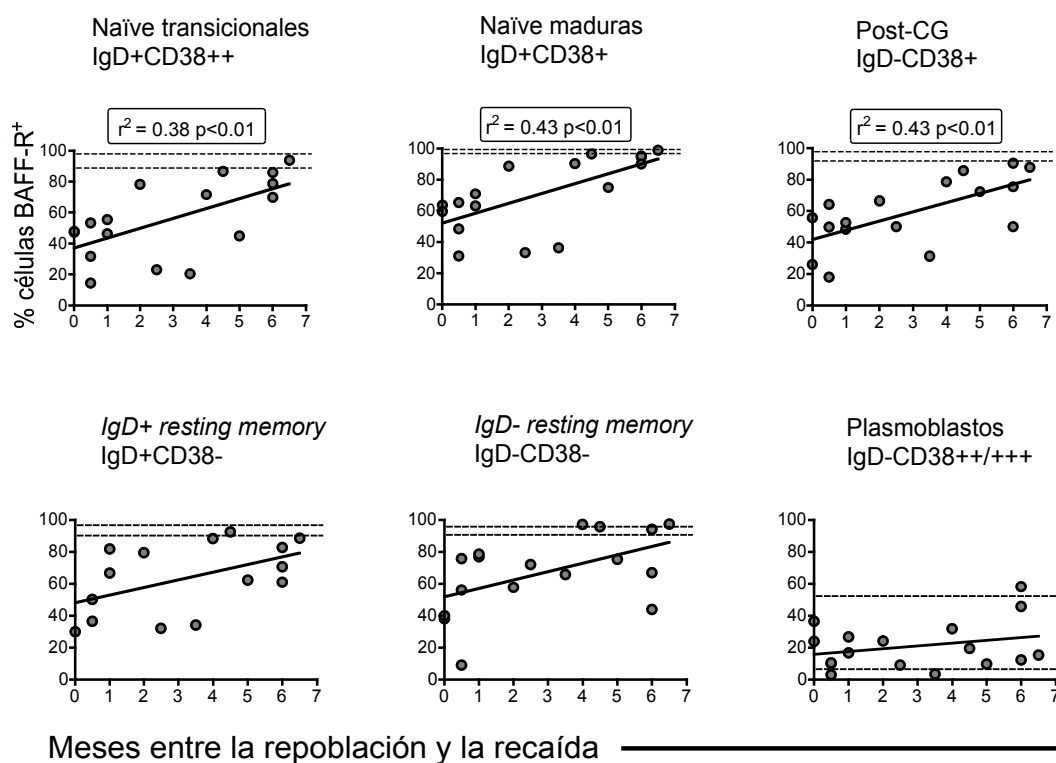


Figura 33: Correlación entre el porcentaje de células BAFF-R+ y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica.

Se encontró una correlación directa estadísticamente significativa entre el tiempo (meses) entre la repoblación periférica y la recaída clínica y el porcentaje de células que expresan BAFF-R en subpoblaciones de células B *naïve* maduras, *naïve* transicionales y post-CG. Las áreas punteadas indican el valor normal de expresión de BAFF-R (porcentaje) en CS.

La expresión MFI de BAFF-R mostraba una correlación significativa con el tiempo desde la repoblación periférica en células B *naïve* transicionales ($r^2=0.53$ $p<0.001$), post-CG ($r^2=0.33$ $p<0.05$), IgD- *resting memory* ($r^2=0.34$, $p<0.05$) y plasmoblastos ($r^2=0.41$, $p<0.01$).

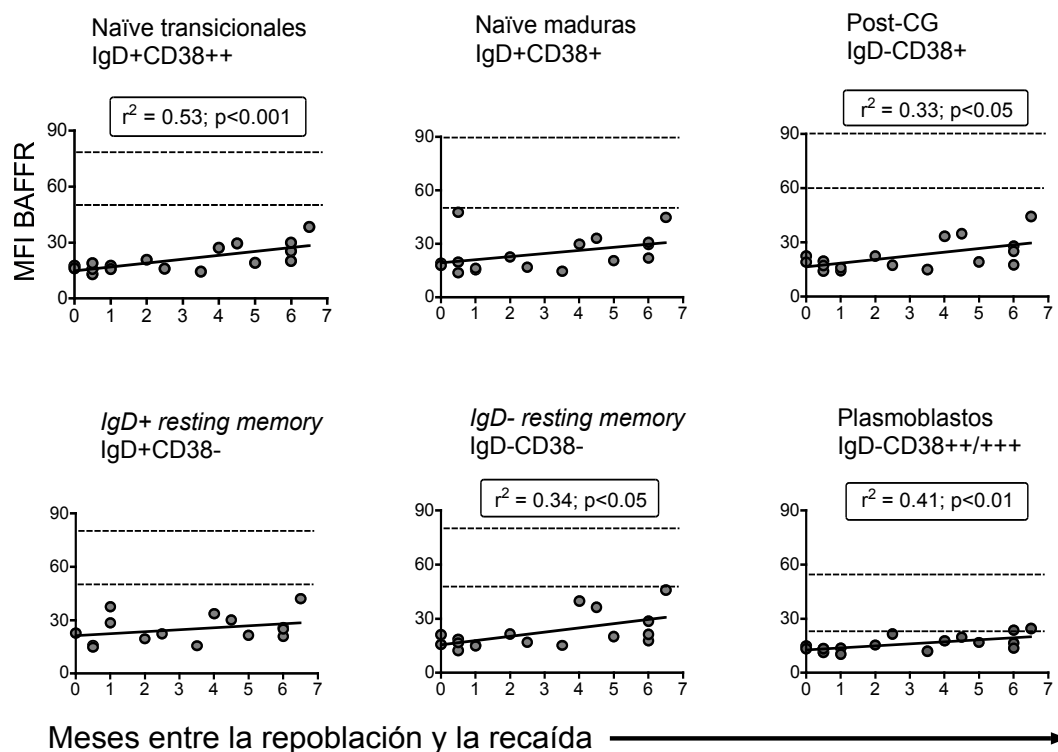


Figura 34: Correlación entre la MFI de BAFF-R y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica.

Se encontró una correlación directa estadísticamente significativa entre el tiempo (meses) entre la repoblación periférica y la recaída clínica y la MFI de BAFF-R en subpoblaciones de células B *naïve* transicionales, post-CG, IgD- *memory resting* y plasmoblastos. Las áreas punteadas indican el valor normal de expresión de BAFF-R (MFI) en CS.

No se encontró ninguna correlación entre la expresión de TACI y BCMA (porcentaje y MFI) y el tiempo desde la repoblación periférica en ninguno de los subtipos celulares estudiados (*gráficos no mostrados*).

5. Niveles de BAFF

Los niveles séricos de BAFF se muestran en el siguiente gráfico. La mediana de los niveles de BAFF en pacientes pre-RTX (1.43 ng/ml, rango 0.84-2.39) estaba significativamente elevada ($p < 0.05$) en comparación con los CS (1.1 ng/ml, rango 0.89-1.24), pero en ambos subgrupos los niveles estaban dentro del rango normal descrito para CS (< 2.45 ng/ml). Los niveles de BAFF en ambos grupos post-RTX estaban significativamente elevados en comparación con los CS y pacientes pre-RTX; la mediana de los niveles de BAFF en pacientes con R-C era de 2,33 ng/ml (rango 0,96-6,47), y en pacientes con R-D había descendido a 1.72 ng/ml (rango 1,14-4,35). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes post-RTX.

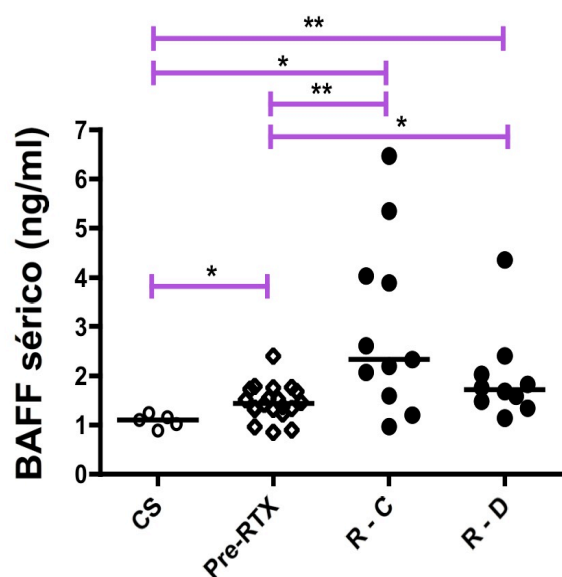


Figura 35: Niveles de BAFF sérico en CS, pacientes pre-RTX, y pacientes post-RTX.

Los niveles de BAFF sérico aumentan tras RTX y disminuyen de nuevo en el momento de la repoblación. Los niveles de BAFF estaban significativamente elevados en ambos grupos de pacientes post-RTX comparados con CS y pacientes pre-RTX. No se vieron diferencias significativas entre los pacientes con R-C y R-D (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

No se observaron correlaciones significativas entre los niveles de BAFF y el tiempo entre la repoblación periférica y la recaída clínica, ni entre los niveles de BAFF

y en número de ciclos de RTX recibidos. No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de BAFF y el porcentaje o valor absoluto de los subtipos de células B (*gráficos no se muestran*).

6. ¿Hay correlación entre los niveles de BAFF sérico y la expresión de BBRs?

Se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células BAFF-R⁺ en todos los subtipos celulares excepto los plasmoblastos ($p<0.0001$) en células B *naïve* transicionales ($r^2=0.39$); *naïve* maduras ($r^2=0.45$); post-CG ($r^2=0.49$) y IgD-*resting memory* ($r^2=0.42$).

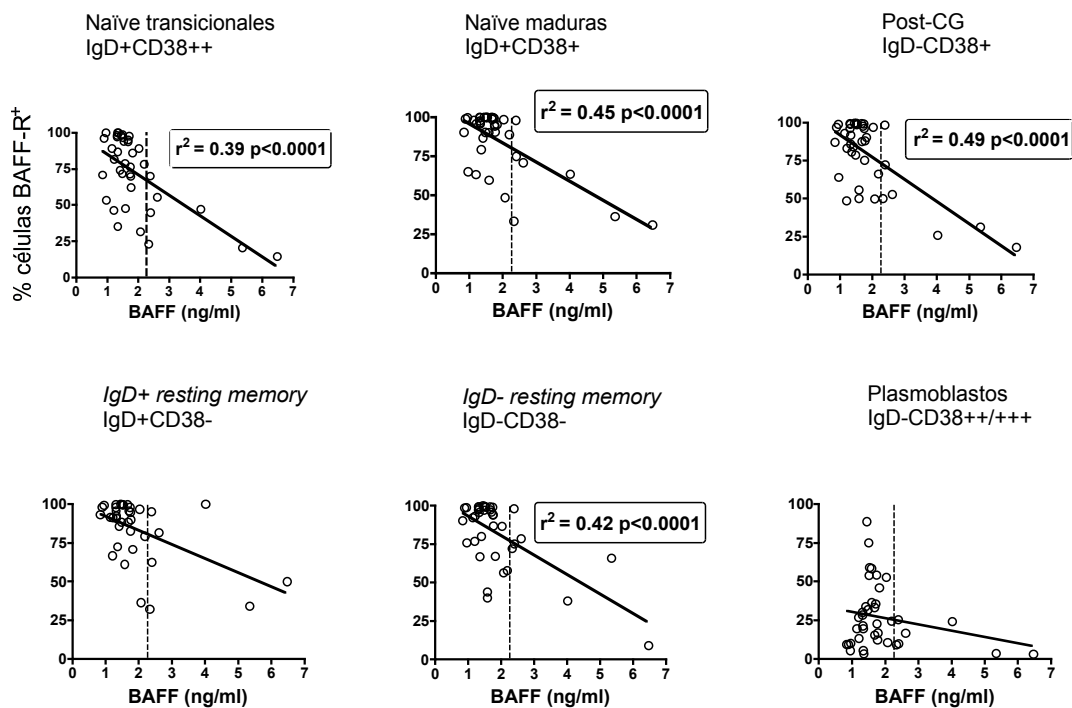


Figura 36: Correlación entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células B BAFF-R⁺ en pacientes con AR.

En esta gráfica se incluyen los pacientes con AR pre y post-RTX. Se observa una correlación inversa significativa en células B *naïve* (transicionales y maduras) y en células memoria (post-CG e IgD-*memory resting*). La correlación no fue significativa en plasmoblastos. Las áreas punteadas indican el límite alto del valor normal de BAFF en CS.

En pacientes post-RTX, la correlación descrita se mantenía para todos los subtipos celulares, a excepción de los plasmoblastos nuevamente, y de las células IgD+ *resting memory* ($p < 0.001$) en células B post-CG ($r^2 = 0.50$) y $p < 0.01$ en *naïve* transicionales y maduras ($r^2 = 0.41$ en ambas) e IgD- *resting memory* ($r^2 = 0.39$).

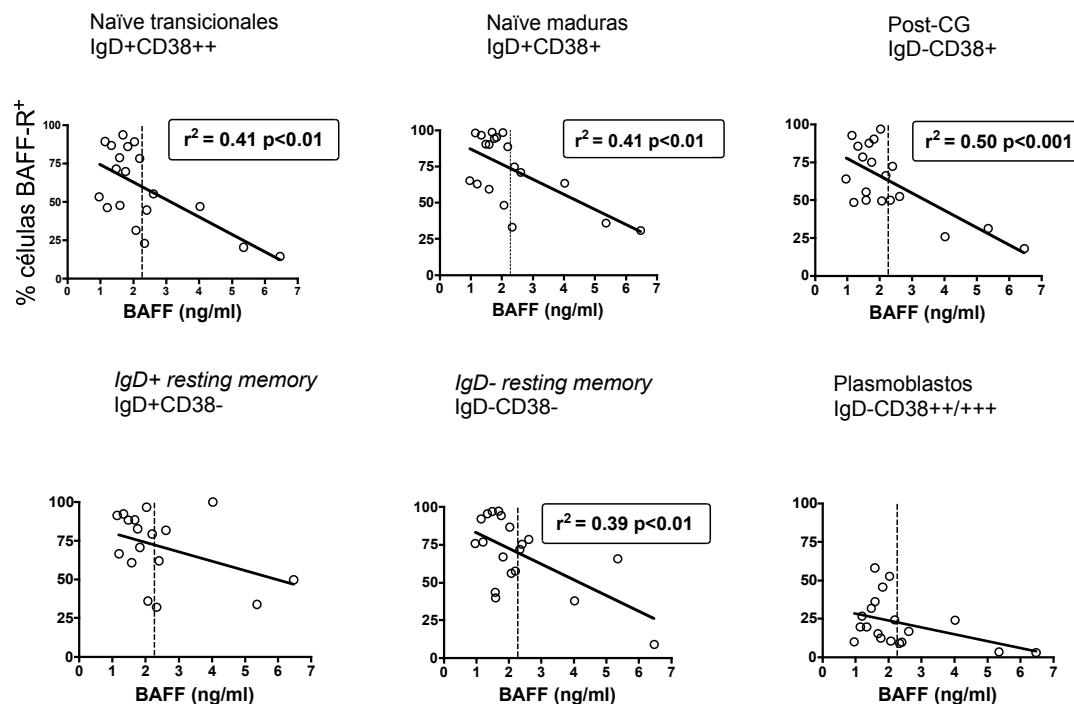


Figura 37: Correlación entre los niveles de BAFF y el porcentaje de células B BAFF-R+ en pacientes post-RTX.

Se mantiene la correlación inversa significativa en ambas subpoblaciones de células B *naïve*, y en células B post-CG e IgD- *memory resting*. Las áreas punteadas indican el límite alto del valor normal de BAFF en CS.

No se encontró una correlación significativa entre la MFI de BAFF-R y los niveles de BAFF (*gráficos no mostrados*).

Los estudios de la relación entre la expresión de TACI y BCMA con los niveles de BAFF sérico no mostraron correlaciones significativas en ninguno de los subtipos celulares estudiados (*gráficos no mostrados*).

Expresión de BAFF-R en subpoblaciones de células B en pacientes con PTT tras depleción terapéutica de linfocitos B

Los datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio se resumen en las tablas 6 y 7. La edad media de los pacientes con PTT era de 50 años (mediana 52, rango 16-79). La edad media de los pacientes con AR incluidos en este estudio fue de 50 años (mediana 46, rango 31-80 años).

La obtención de muestras para este estudio fue difícil pues la PTT suele ser muy grave, y el tratamiento se instaura inmediatamente, sin tener la posibilidad de recoger las muestras previamente. Por ello solo hay 3 muestras de pacientes con PTT aguda, que se han incluido en el análisis descriptivo pero no en el estadístico. Los 3 casos “de novo” incluidos habían recibido corticoides y plasmaféresis antes de la toma de muestras. Se estudiaron 5 pacientes con PTT en el momento de la repoblación periférica (5-10 meses después de RTX). En los 12 pacientes en remisión, la repoblación periférica se confirmó en muestras tomadas 10-68 meses después del tratamiento con RTX, y en todos ellos se objetivaron contajes de células CD19+ en rango normal. No hay datos del momento de la repoblación periférica en los 12 pacientes en remisión.

***Tabla 6: Características demográficas y datos de laboratorio en pacientes
con PTT***

	Edad	Género	Nº plaquetas (x10 ⁹ /L)	ADAMTS13 (% del valor normal)	Nº ciclos	Meses desde RTX
PTT AGUDA						
1	65	M	16	26		
2	52	M	9	<5		
3	53	F	12	<5		
PTT EN REPOBLACIÓN						
1*	65	M	215	96	1	10
4	64	M	259	40	1	7
5	26	M	299	102	2	8
6	79	F	204	>100	1	5
7	36	F	335	88	1	6
PTT EN REMISIÓN						
8	41	M	174	34	1	32
9	43	F	265	>100	1	44
10	53	F	288	75	1	68
11	16	F	277	37	1	18
12	72	M	475	91	1	14
13	52	F	289	>100	1	29
14	63	M	216	58	1	31
15	45	M	246	<5	1	51
16	44	M	191	115	1	33
17	42	F	274	109	1	54
18	29	F	544	99	1	10
19	57	F	279	16	1	60

* 1 y 1* son distintas muestras del mismo paciente

Tabla 7: Características demográficas y datos de laboratorio de los pacientes con AR incluidos en el estudio comparativo con PTT

	Edad	Género	FR	Ac anti-PCC	Años de enfermedad	Meses desde RTX	Nº ciclos
1	45	F	+	+	12	6	1
2	32	F	-	-	2	10	1
3	80	F	+	+	22	6	1
4	60	F	+	+	4	5	1
5	40	F	+	+	3	6	1
6	48	F	-	-	3	7	1

1. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación tras rituximab

La siguiente figura muestra las subpoblaciones de linfocitos B definidas según la expresión de IgD/CD27 en el momento de la repoblación en un paciente con PTT y un paciente con AR.

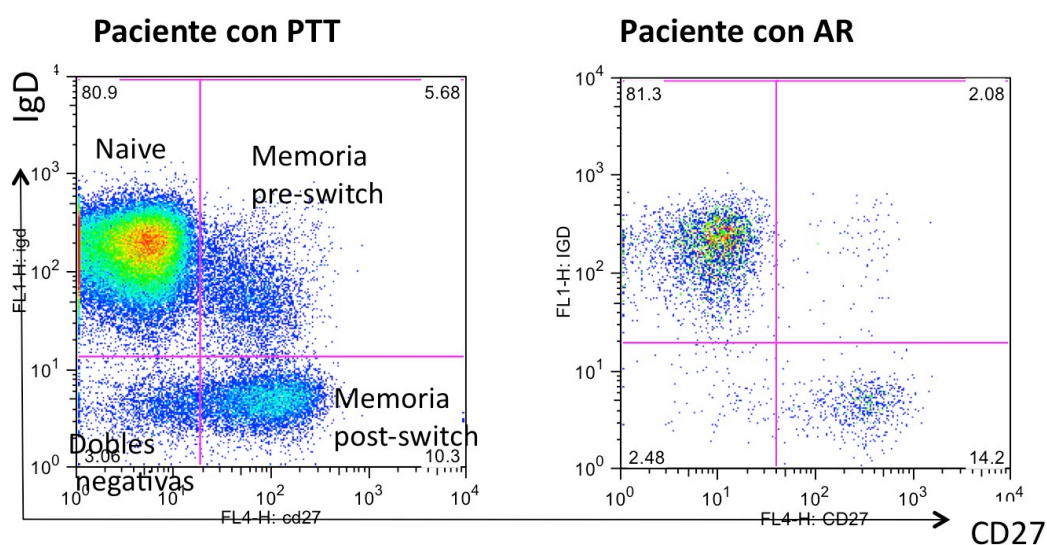


Figura 38: Ejemplos de análisis citométrico de un paciente con PTT y otro con AR, según la clasificación IgD/CD27.

En ambos casos, el fenotipo predominante fue el de células B *naïve*. Los porcentaje y valores absolutos de todas las subpoblaciones fueron similares y, aunque se observó un mayor porcentaje de células memoria post-*switch* (IgD-CD27+) en pacientes con PTT en comparación con AR, las diferencias no fueron significativas.

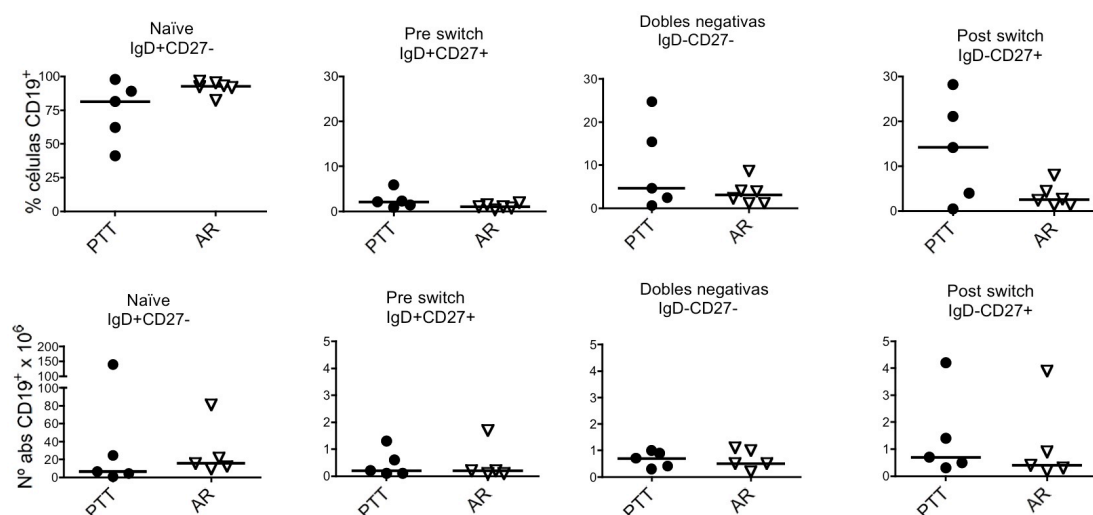


Figura 39: Comparación de las subpoblaciones de células B en pacientes con AR y PTT en el momento de la repoblación.

En los gráficos se muestra el porcentaje y valor absoluto de células CD19+ en cada subpoblación, para ambas enfermedades. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

2. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con PTT en remisión tras la repoblación

En los siguientes análisis se han comparado medianas. La figura muestra el porcentaje y valor absoluto de las subpoblaciones de células B. La mayoría de linfocitos B en pacientes en remisión tras RTX continúan siendo *naïve* (al igual que en el momento de la repoblación), con una elevación significativa del porcentaje de células B *naïve* respecto a los CS (91.8 %, rango 82.8-96.8 % vs 62 %, rango 50.2-78.6 %, p < 0.001).

$p < 0.01$), y un menor porcentaje de linfocitos B memoria pre y post-*switch* en comparación con los CS (1.5 %, rango 0.4-5.4 % vs 9.6 %, rango 6.9-18.1 % y 1.7 %, rango 0.45-9.9 % vs 18.2, rango 11-35.9 % respectivamente, $p < 0.05$ en ambos).

El valor absoluto de linfocitos en todas las subpoblaciones aumentó significativamente entre los pacientes en el momento de la repoblación y pacientes en remisión: células B *naïve*: 6.4×10^6 células, rango 0.7-139.8 $\times 10^6$ vs 174.9×10^6 , rango 66.2-1098 $\times 10^6$, $p < 0.01$; dobles negativas: 0.7×10^6 , rango 0.3-1 $\times 10^6$ vs 5.4×10^6 , rango 0.7-89.9 $\times 10^6$, $p < 0.01$; memoria pre-*switch*: 0.2×10^6 , rango 0.1-1.3 $\times 10^6$ vs 4×10^6 , rango 0.7-15.6 $\times 10^6$, $p < 0.01$; el menor incremento se vio en las células memoria post-*switch* (0.7×10^6 , rango 0.3-4.2 $\times 10^6$ vs 3.9×10^6 , rango 0.7-122.1 $\times 10^6$, $p < 0.05$).

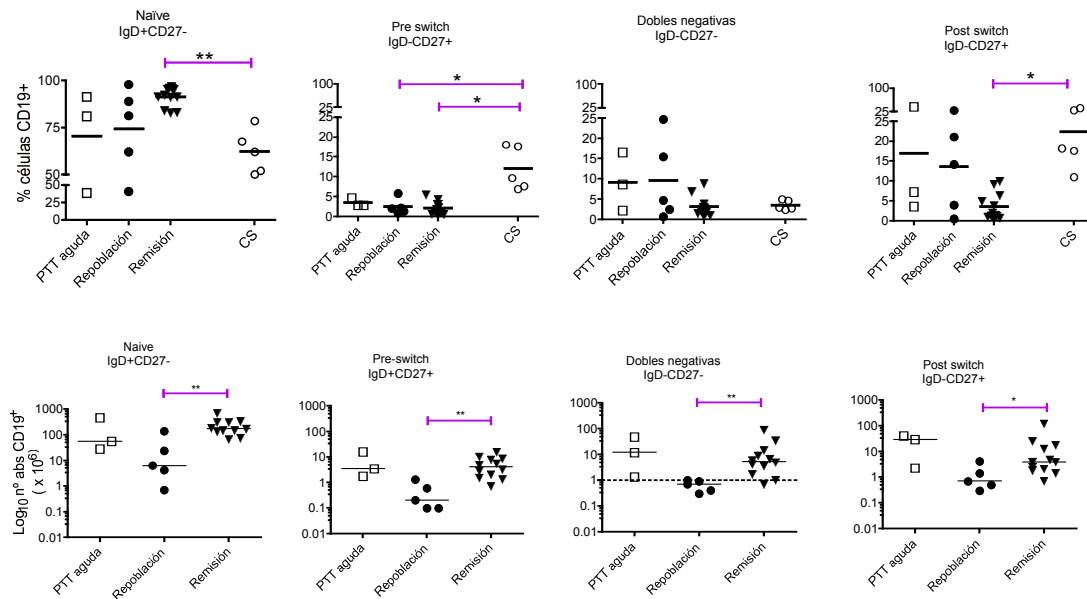


Figura 40: Evolución de las subpoblaciones de células B en pacientes con PTT antes y después de RTX.

En estos gráficos se representan los porcentaje y valores absolutos de los distintos subtipos de linfocitos B estudiados, y se comparan con los CS. La mayoría de linfocitos B en pacientes en remisión tras RTX continúan siendo *naïve*. El valor absoluto de linfocitos en todas las subpoblaciones aumentó significativamente entre los pacientes en el momento de la repoblación y pacientes en remisión (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

3. ¿Hay alguna correlación entre las subpoblaciones de células B y el tiempo desde la administración de RTX?

Para las siguientes determinaciones, se ha usado el tiempo desde la administración de RTX en lugar del tiempo desde la repoblación como se había hecho en AR. El momento exacto del inicio de la repoblación periférica en pacientes con PTT en remisión se desconoce porque no se determinaba el conteo de linfocitos CD19+ de forma rutinaria.

El análisis de regresión confirmó un descenso significativo del porcentaje de células B *naïve* dependiente del tiempo transcurrido desde la primera infusión de RTX. Los porcentaje de células B *post-switch* e IgD-CD27- aumentaron significativamente en relación con el tiempo transcurrido desde RTX. Sin embargo el porcentaje de células B memoria *pre-switch* aumentó muy poco incluso tras 68 meses de seguimiento. Solamente el porcentaje de células B memoria dobles negativas (IgD-CD27-) alcanzó valores similares a los de los CS (2.4 %, rango 0.6-8.7 vs 2.8 %, rango 2.3-4.9), tras 2-3 años del tratamiento.

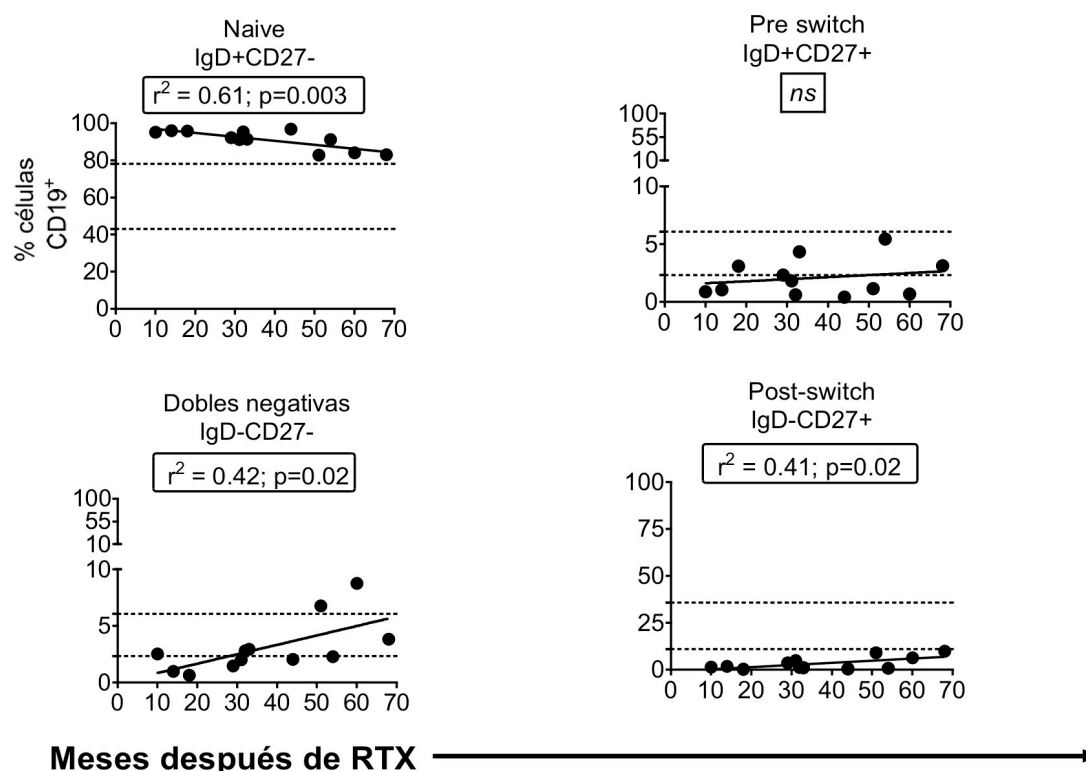


Figura 41: Relación entre el porcentaje de cada subtipo de célula B y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX.

En esta figura se representa el porcentaje de cada subtipo de célula B frente al tiempo transcurrido desde la infusión de RTX, en pacientes con PTT en remisión durante > 10 meses tras el tratamiento con RTX. El análisis confirmó un descenso significativo del porcentaje de células B *naïve* dependiente del tiempo transcurrido desde la primera infusión de RTX. Los porcentaje de células B *post-switch* y *dobles negativas* aumentaron significativamente en relación con el tiempo transcurrido desde RTX. Las áreas punteadas indican el valor normal de las subpoblaciones en CS.

4. Expresión de BAFF-R en el momento de la repoblación

La figura siguiente muestra la expresión de BAFF-R en células CD19+ en un paciente con AR y una paciente con PTT en el momento de la repoblación periférica, apreciando que la expresión de BAFF-R está reducida también en el paciente con PTT. El porcentaje de células CD19+ que eran positivas para BAFF-R fue aproximadamente la mitad que los CS.

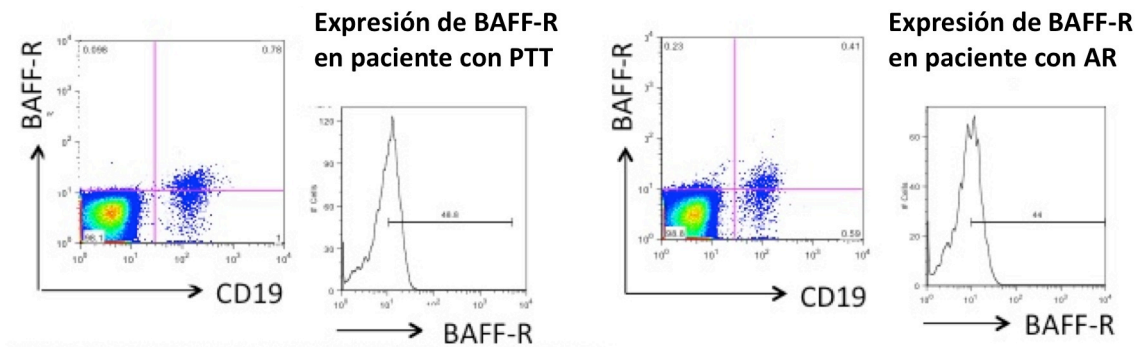


Figura 42: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación.

El gráfico muestra la representación de BAFF-R/CD19 después de haber seleccionado la población de linfocitos, y el histograma muestra la expresión relativa de BAFF-R después de seleccionar la subpoblación CD19+.

La observación anterior se confirmó al comparar la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) en ambas cohortes de pacientes. No se vieron diferencias significativas al comparar ambos subgrupos de pacientes. Cuando ambos se compararon con los CS, se observó que el porcentaje de células BAFF-R+ era significativamente más bajo en ambas enfermedades, en todos los subtipos celulares (Mann Whitney Rank Sum): células B *naïve*: 99.8 %, rango 99.3-99.9 en CS vs 47.9 %, rango 30.8-68.9 %, $p < 0.01$ en AR y 44 %, rango 18.9-85 %, $p < 0.01$ en PTT; dobles negativas: 98 %, rango 96.2-99 % en CS vs 34.7 %, rango 23.3-48.12 %, $p < 0.01$ en AR y 16.7 %, rango 7.6-59.6 %, $p < 0.01$ en PTT; memoria *pre-switch*: 99.7 %, rango 99.5-99.8 % en CS vs 55 %, rango 44.3-66.7 %, $p < 0.01$ en AR y 65.2 %, rango 26.7-83.3 %, $p < 0.01$ en PTT; memoria *post-switch*: 98.1 %, rango 97.5-98.8 % en CS vs 55.75, rango 35.9-65.8 %, $p < 0.01$ en AR y 51.1 %, rango 10.7-74.1 %, $p < 0.01$ en PTT.

No se encontraron diferencias significativas en la MFI de BAFF-R entre ambos subgrupos de pacientes. La MFI de BAFF-R fue significativamente más baja en ambos subgrupos de pacientes en comparación con los CS: en células B *naïve*: 60.4 MFI, rango

54.8-84.2 en CS vs 17.4 MFI, rango 13.6-24.2, $p < 0.01$ en AR y 15.2 MFI, rango 12.7-23.1, $p < 0.05$ en PTT; dobles negativas: 60.7 MFI, rango 58.4-80.4 en CS vs 16.1 MFI, rango 11.3-34, $p < 0.01$ en AR y 15.5 MFI, rango 12.7-31.1, $p < 0.01$ en PTT; memoria pre-switch: 65.3 MFI, rango 60.8-83.5 en CS vs 19.6 MFI, rango 14.6-38, $p < 0.01$ en AR y 18 MFI, rango 14.5-63.8, $p < 0.01$ en PTT; memoria post-switch: 67.5 MFI, rango 61.7-83.1 en CS vs 18.9 MFI, rango 13.6-43, $p < 0.01$ en AR y 15.1 MFI, rango 13.3-43, $p < 0.05$ en PTT.

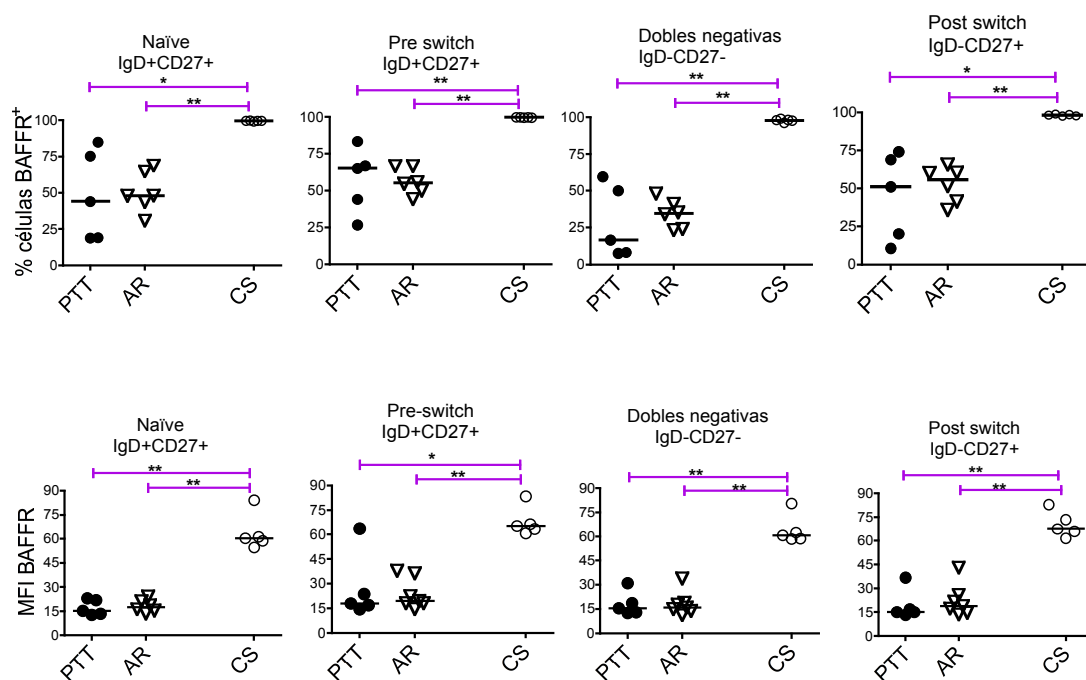


Figura 43: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT y AR en el momento de la repoblación. El porcentaje y MFI de células CD19+ que expresan BAFF-R se calculó en pacientes con PTT y AR en las 4 subpoblaciones de células B definidas en base a la clasificación IgD/CD27. No se vieron diferencias significativas al comparar ambos subgrupos de pacientes. Cuando ambos se compararon con los CS, se observó que el porcentaje de células BAFF-R+ era significativamente más bajo en ambas enfermedades, en todos los subtipos celulares (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

5. Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT después de la repoblación

Aunque no se realizaron estudios estadísticos con los pacientes con PTT aguda, parece que esos pacientes el porcentaje de células BAFF-R+ era similar a los CS. Como se ha visto en el punto anterior, el porcentaje de células B con expresión de BAFF-R fue bajo en todos los subtipos celulares en el momento de la repoblación periférica. El porcentaje de células BAFF-R+ aumentó en pacientes con PTT que permanecieron en remisión tras la repoblación, aproximándose a los valores de los CS.

Así, al comparar los pacientes con PTT en remisión con aquellos en el momento de la repoblación, se apreció un aumento significativo del porcentaje de BAFF-R en todos los subtipos celulares: células B *naïve*: 94.7 %, rango 79.2-98.8 % vs 44 %, rango 18.9-85 %, $p<0.05$; dobles negativas: 89.8 %, rango 70.9-98.4 % vs 16.7 %, rango 7.6-59.6 %, $p<0.01$; memoria *pre-switch*: 89 %, rango 51.1-98.5 % vs 65.2 %, rango 26.7-83.3 %, $p<0.05$; memoria *post-switch*: 87 %, rango 67.1-97.7 % vs 51.1 %, rango 10.7-74.1 %, $p<0.05$.

El porcentaje de expresión de BAFF-R seguía reducida en pacientes con TTP en remisión al compararlos con CS: células B *naïve*: 94.7 %, rango 79.2-98.8 % vs 98.8 %, rango 96.8-99.9 %, $p<0.01$; dobles negativas: 89.8 %, rango 70.9-98.4 % vs 95 %, rango 83.6-98.4 %, $p<0.01$; memoria *pre-switch*: 89 %, rango 51.1-98.5 % vs 98.8 %, rango 96.3-99.8 %, $p<0.01$; memoria *post-switch*: 87 %, rango 67.1-97.7 % vs 97.7 %, rango 95.5-98.8 %, $p<0.01$.

Aunque no se incluyó en el análisis estadístico, la MFI de los pacientes con PTT aguda también parecía menor que en CS. La MFI de BAFF-R aumentó significativamente en pacientes en remisión en comparación con los pacientes en el momento de la repoblación, pero siguió estando reducida en comparación con los CS.

Al comparar los pacientes con PTT en remisión con aquellos en el momento de la repoblación, se apreció un aumento significativo de la MFI de BAFF-R en todos los subtipos celulares excepto células memoria pre-switch: así, en células B *naïve*: 35.2 MFI, rango 15.2-63.5 vs 15.2 MFI, rango 12.7-23.1, $p<0.01$; dobles negativas: 35.1 MFI, rango 19.7-55.4 vs 15.5 MFI, rango 12.7-31.1, $p<0.01$; memoria post-switch: 39 MFI, rango 25.8-52.2 vs 15.1 MFI, rango 13.3-36.7, $p<0.01$.

Sin embargo, la MFI seguía estando significativamente reducida en todas las subpoblaciones de células B en pacientes con TTP en remisión en comparación con los CS: células B *naïve*: 35.2 MFI, rango 15.2-63.5 vs 72.7 MFI, rango 54.8-217, $p<0.01$; dobles negativas: 35.1 MFI, rango 19.7-55.4 vs 69.4 MFI, rango 58.4-181, $p<0.01$; memoria pre-switch: 35.4 MFI, rango 16.7-57.2 vs 74.9 MFI, rango 60.8-216, $p<0.01$; memoria post-switch: 39 MFI, rango 25.8-52.2 vs 78.1 MFI, rango 61.7-229, $p<0.01$.

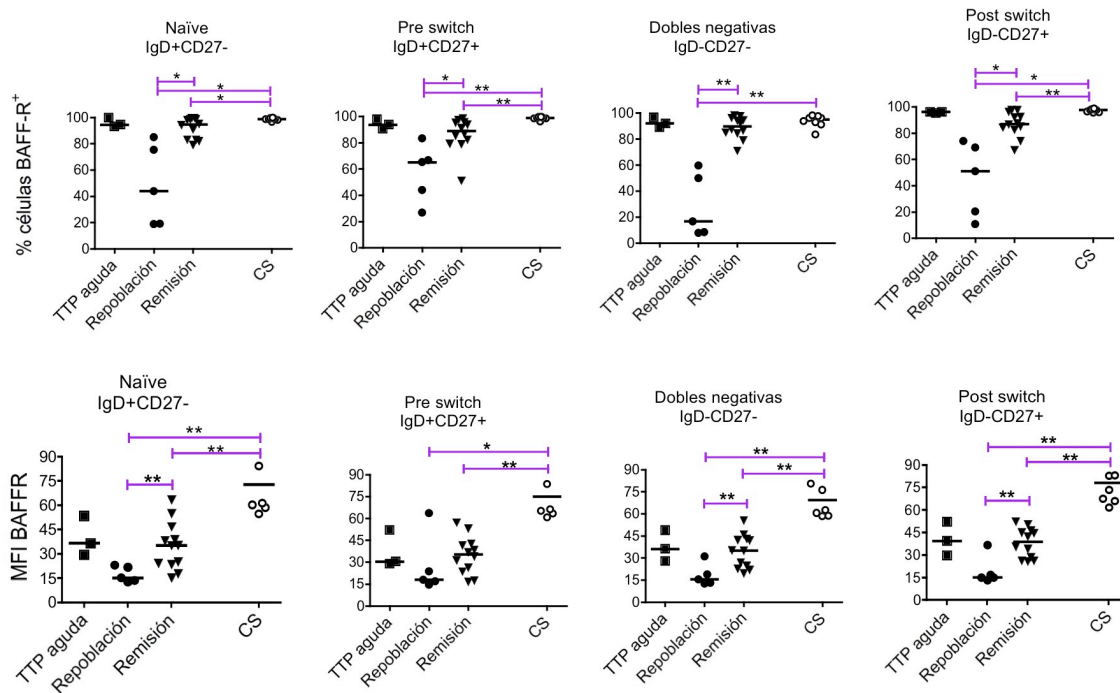


Figura 44: Expresión de BAFF-R en pacientes con PTT antes y después de RTX.

El porcentaje y MFI de células CD19+ que expresan BAFF-R se calculó en pacientes con PTT aguda, en el momento de la repoblación, y en remisión tras la repoblación, en las 4 subpoblaciones de células B definidas en base a la clasificación IgD/CD27. El porcentaje de células B con expresión de BAFF-R fue bajo en todos los subtipos celulares en el momento de la repoblación periférica, pero aumentó en pacientes con PTT que permanecieron en remisión tras la repoblación, aproximándose a los valores de los CS (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

6. ¿Hay alguna correlación entre la expresión de BAFF-R y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX?

El análisis de regresión lineal confirmó que había un aumento gradual de la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI), particularmente en las subpoblaciones *naïve* y *pre-switch*. La expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) se incrementa con el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX, con una correlación directa significativa para el porcentaje en células memoria pre ($r^2 = 0.41$, $p < 0.05$) y post-switch ($r^2 = 0.45$, $p < 0.05$), y para la MFI en todos los subtipos celulares, como muestra la figura. Como se ha visto en el punto anterior, en los pacientes con PTT en remisión, el porcentaje de

células BAFF-R⁺ aumentaba aunque no alcanzaba el rango normal. Sin embargo, la MFI, es decir, el número de receptores por célula continuaba por debajo de los límites normales vistos en los CS, incluso años después de RTX.

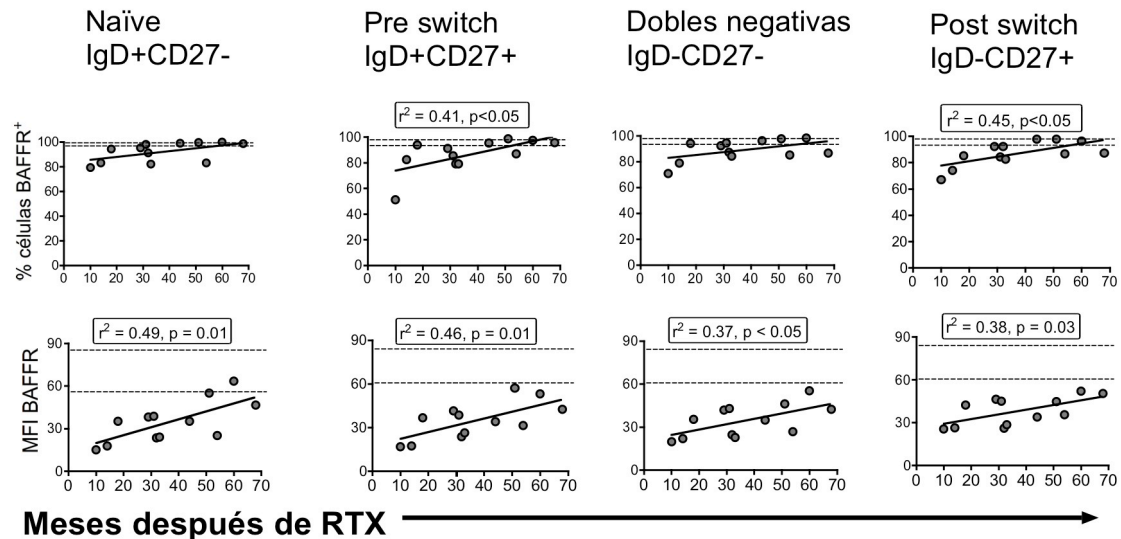


Figura 45: Relaciones entre la expresión de BAFF-R y el tiempo desde el tratamiento con RTX.

En la figura se representan los porcentaje y MFI de células B que expresan BAFF-R en pacientes con PTT en remisión tras tratamiento con RTX. La expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) se incrementa con el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX, con una correlación directa significativa para el porcentaje en células memoria pre y post-switch, y para la MFI en todos los subtipos celulares. Las áreas punteadas indican el valor normal de las subpoblaciones en CS.

7. Niveles de BAFF

En los 3 pacientes con PTT aguda, los niveles de BAFF estaban dentro de los límites normales (<1.9ng/ml), pero pueden estar influenciados por el tratamiento recibido antes de RTX (corticoides/plasmaféresis). Después de RTX, la mediana de los niveles de BAFF estaban significativamente elevados en el momento de la repoblación, en comparación con los CS (3.1 ng/ml, rango 1.6-4.4 vs 1 ng/ml, rango 0.9-1, p<0.05). En los pacientes en remisión, la mediana de los niveles de BAFF se había reducido significativamente en comparación con los pacientes con PTT en el momento de la

repoblación (1.49 ng/ml; rango 0.9-3.2 vs 3.1 ng/ml, rango 1.6-4.4, $p<0.05$). No se encontró significación estadística al comparar los pacientes en remisión con los CS.

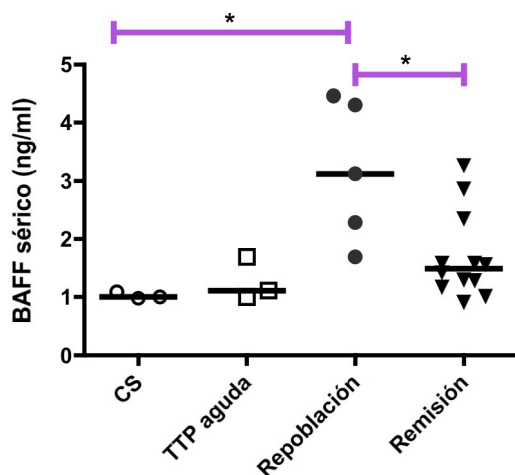


Figura 46: Niveles de BAFF sérico en CS, y pacientes con PTT antes y después de RTX.

Después de RTX, los niveles de BAFF estaban significativamente elevados en el momento de la repoblación, en comparación con los CS. En los pacientes en remisión, la mediana de los niveles de BAFF se había reducido significativamente en comparación con los pacientes con PTT en el momento de la repoblación ($*p<0.05$).

Se encontró una correlación negativa significativa ($r^2 = 0.55$, $p<0.01$) entre los niveles séricos de BAFF y el tiempo transcurrido desde el tratamiento, con los mayores niveles de BAFF en pacientes con menor tiempo transcurrido desde el tratamiento.

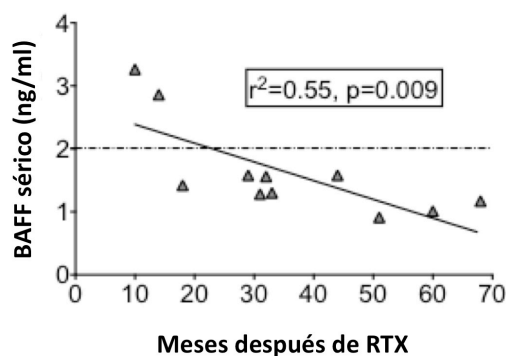


Figura 47: Relación entre los niveles de BAFF y el tiempo transcurrido desde el tratamiento con RTX en pacientes con PTT en remisión.

Se encontró una correlación negativa entre los niveles séricos de BAFF y el tiempo transcurrido desde el tratamiento. Las áreas punteadas indican el límite alto del valor normal de BAFF en CS.

Los niveles de BAFF también se intentaron correlacionar con el número de células CD19+ en pacientes en remisión, no encontrando correlación significativa, pero se apreció que el conteo de células B CD19+ se había recuperado completamente, con niveles normales (*gráfico no mostrado*).

8. ¿Hay correlación entre los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R?

Hay una correlación inversa estadísticamente significativa en todos los subtipos de células B entre los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) en pacientes en remisión.

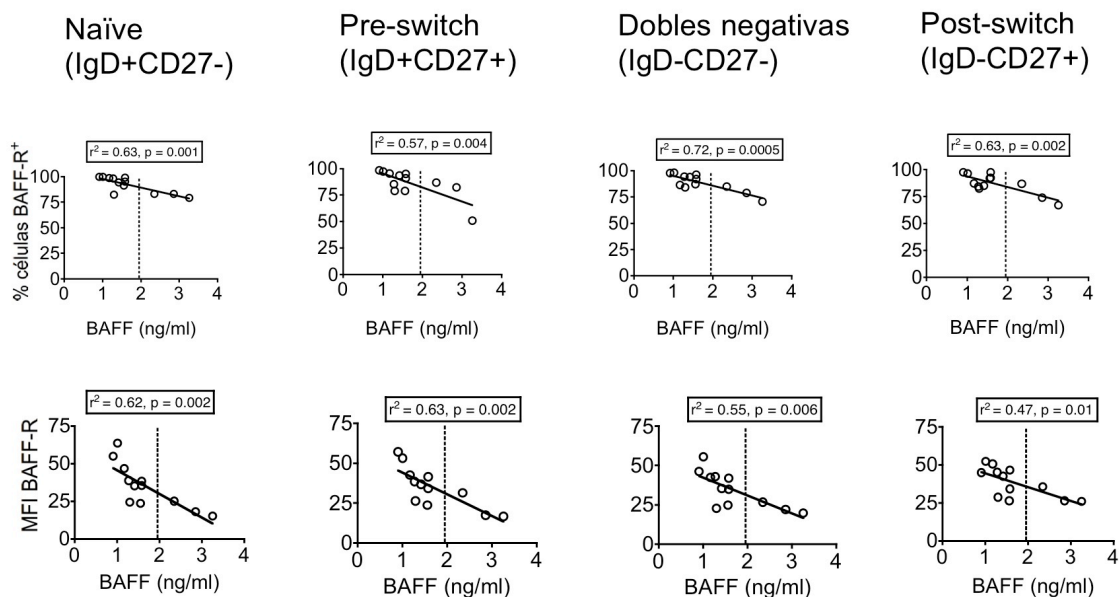


Figura 48: Correlación entre los niveles de BAFF y la expresión de BAFF-R en pacientes con PTT en remisión tras RTX.

La expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) se ha correlacionado con los niveles de BAFF séricos en todas las subpoblaciones de células B estudiadas, encontrando una correlación inversa estadísticamente significativa en todos los subtipos de células B. Las áreas punteadas indican el límite alto del valor normal de BAFF en CS.

DISCUSIÓN

Patrones de recaída en la cohorte de pacientes con AR de UCL tratada con RTX

La depleción terapéutica de linfocitos B mediante RTX es una terapia efectiva y segura en AR, como se demuestra en múltiples estudios en la literatura, con datos disponibles a largo plazo (más de 10 años) [45, 48-50, 77]. Se ha confirmado la existencia de dos patrones de recaída después de la administración de RTX [37, 75], aunque en este estudio, las frecuencias de ambos patrones de recaída difieren de las observaciones iniciales. La R-C es más frecuente que la R-D (70% vs 30%).

El tiempo transcurrido hasta la repoblación de células B en sangre periférica y el patrón de recaída posterior para cada paciente es importante en la práctica clínica diaria ya que puede ayudar a determinar la duración de cada ciclo de RTX, como se ha comprobado en la revisión de la cohorte de pacientes de UCL, aunque existe gran variabilidad entre pacientes. Existen dos ventajas principales. En primer lugar, el médico puede evitar ciclos innecesarios de RTX, reduciendo el coste del tratamiento. Un estudio reciente de coste-efectividad destacó que el tratamiento con RTX administrado en el momento de la recaída era al menos equivalente en términos de coste-efectividad a un régimen más intensivo [188].

La segunda ventaja a destacar es la reducción de efectos secundarios. La administración de ciclos repetidos de RTX se puede asociar a hipogammaglobulinemia

[45, 66], que aumenta claramente con los ciclos repetidos de RTX, especialmente el descenso de IgM, y en menor frecuencia de IgG [67], sobre todo en pacientes tratados con un esquema fijo de RTX cada 6 meses [79]. En pacientes predispuestos puede producir un aumento del número de infecciones [68].

Como se ha visto en la práctica clínica habitual de UCL, la mayoría de pacientes mantienen el mismo patrón de recaída, lo cual supone una ventaja para planificar ciclos de tratamiento preventivos. En algunos pacientes incluso se ha visto que la duración de la remisión aumenta después de varios ciclos. Otra observación destacable es que los pacientes con actividad inflamatoria persistente después de 1-2 ciclos de tratamiento mejoran la respuesta a RTX después de varios ciclos de tratamiento [56], probablemente porque ciclos sucesivos de RTX consigan una mayor depleción de células B en los tejidos sólidos.

Las estrategias de retratamiento en UCL se basan en la experiencia del especialista, adquirida a partir de observaciones clínicas previas [64, 189]. En esa consulta especializada se monitoriza estrictamente el conteo de linfocitos CD19+. En la práctica clínica, debería determinarse antes de la infusión de RTX, 3 meses después del tratamiento para confirmar la depleción, y posteriormente cada 2-3 meses hasta que se inicia la repoblación periférica de linfocitos B. Los pacientes deben seguirse y tratarse con un segundo ciclo en cuanto tengan síntomas de recaída de la enfermedad. Los ciclos siguientes deberían planificarse de acuerdo con la duración del ciclo previo [76]. Esta estrategia se ha aplicado en los últimos años, y los pacientes habitualmente reciben el siguiente ciclo de tratamiento un mes antes del tiempo calculado de recaída, según el ciclo previo, evitando la recaída en la mayoría de los casos.

Los estudios disponibles sobre ciclos repetidos con RTX son muy limitados. La mayoría de estudios siguen la estrategia “treat-to-target”, como se recomienda en el último consenso sobre el uso de RTX en AR, considerando un segundo ciclo de tratamiento a las 24 semanas en pacientes que no alcanzan la remisión tras el primer ciclo, o tienen una baja actividad de la enfermedad [50]. El estudio de Emery también recomendaba una estrategia “treat-to-target”, persiguiendo alcanzar un índice DAS28 de remisión, reduciendo la frecuencia de brotes de AR con la misma tasa de infecciones y efectos adversos serios [190]. El registro belga *MIRA*, que sigue 401 pacientes, recomienda retratar a los pacientes antes de que tengan un brote severo; también recomiendan ciclos de tratamiento repetidos de forma sistemática en pacientes con actividad residual de la enfermedad ($\text{DAS28} > 3,2$) [191].

Sin embargo, otros estudios recomiendan otras estrategias de tratamiento. Un estudio suizo recomienda retratar a los pacientes respondedores con enfermedad inflamatoria residual a los 6 meses del primer ciclo de RTX. En pacientes con respuesta completa recomiendan sin embargo “esperar y ver”, retratando en cuanto haya síntomas de actividad [192]. La estrategia seguida en UCL sigue este algoritmo, pero añade la posibilidad de pautar ciclos preventivos de tratamiento según la duración del ciclo previo, para evitar nuevos brotes [76]. Un estudio alemán reciente valoró la utilidad de la ecografía Power Doppler para detectar cambios inflamatorios y por tanto determinar la necesidad de retratamiento con RTX. En este estudio se concluyó que la ecografía Power Doppler podía detectar la recaída de la enfermedad antes del empeoramiento de los síntomas, por lo que puede ser el instrumento más útil para evaluar la actividad de la enfermedad y poder tomar decisiones terapéuticas más tempranas [193].

Subpoblaciones de células B en pacientes con AR y PTT después de RTX

En el experimento realizado en AR, el alto porcentaje de células B transicionales de los pacientes con una R-C refleja el momento inicial de la repoblación de células B, caracterizado por células inmaduras, que se convierten rápidamente en células *naïve* maduras [37, 38]. Los pacientes con R-C tienden a recaer con un mayor porcentaje y números absolutos de células *naïve* transicionales y los pacientes con R-D tienen mayores porcentaje y valores absolutos de células B *naïve* maduras.

El porcentaje y números absolutos de plasmoblastos estaba aumentado en el momento de la repoblación, pero sin diferencias significativas. Este hallazgo sugiere que en los pacientes con R-C hay una rápida diferenciación de las células B *naïve* hasta un fenotipo de plasmoblasto, que precipitaría la recaída. Se ha sugerido que, después de RTX, las subpoblaciones presentes en el momento de la repoblación periférica pueden predecir el tipo de recaída en los pacientes con AR [58]. Una proporción de células B transicionales ya estaría destinada a la diferenciación a células secretoras de Ac en pacientes con R-C. El aumento en los títulos de autoanticuerpos que se asocian a la recaída tras RTX apoya esta posibilidad [63]. Las células B memoria están reducidas en el momento de la repoblación, y tienden a aumentar progresivamente después de algunos meses, pero persisten disminuidas en los pacientes analizados con R-D.

En el estudio de pacientes con PTT y AR, no se han encontrado diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos en el momento de la repoblación,

aunque se vio una tendencia a un mayor porcentaje de células B memoria post-*switch* en pacientes con PTT, a pesar de estar en remisión clínica. En pacientes con PTT en remisión, el porcentaje de células B memoria pre y post-*switch* seguía siendo más bajo que en los CS, con un incremento pequeño a pesar de seguimiento hasta 5_{1/2} años. Incluso en ese caso, las cifras no alcanzaron las de los CS.

La repoblación después de la depleción terapéutica de linfocitos B se inicia con células B *naïve*, con un porcentaje de células B memoria bajo [37, 194]. Una de las primeras observaciones descritas después de la administración de RTX en enfermedades autoinmunes fue que la recaída se producía o bien en el momento de la repoblación, o después de ésta, y que la repoblación seguía pasos similares al proceso de ontogenia de la célula B [37, 38]. Sin embargo, el número de células B con el que se inicia la repoblación no es un indicador fiable de la probabilidad de recaída de la enfermedad, ni en AR ni en PTT [64, 128].

La repoblación con células B memoria reducidas puede reflejar un efecto indirecto de RTX en células B a largo plazo, que se ha visto tanto en el trasplante de órganos [35] como en otras enfermedades autoinmunes [37, 40]. Los motivos no quedan claros, pero se ha sugerido que las reacciones en los CG pueden estar alteradas por cambios en su microambiente, en relación con la ausencia o reducción de células B maduras [39, 40, 195].

Hasta la fecha, todos los pacientes que responden al tratamiento con RTX recaen eventualmente, aunque se ha visto una reducción en los síntomas que puede mantenerse durante meses, o incluso años. Sin embargo, la mayoría de pacientes con PTT tratados

con RTX se mantienen en remisión durante años o incluso de por vida con un único ciclo de tratamiento. El estudio de la PTT en pacientes en remisión tras un ciclo de RTX ha resultado muy útil para el seguimiento de los efectos que RTX tiene a largo plazo en las subpoblaciones de linfocitos B. Los pacientes con AR suelen necesitar múltiples ciclos de tratamiento, por lo que se dispone habitualmente de muestras de pacientes que hayan estado en remisión tanto tiempo.

Los resultados también sugieren que la reconstitución lenta de células B en pacientes con PTT está relacionada con la remisión prolongada. Como la recaída está asociada con el aumento de autoanticuerpos contra ADAMTS13, la selección y diferenciación de clones de células B autorreactivas de poblaciones de células *naïve* o memoria debe ser un paso importante. Si la producción de anti-ADAMTS13 deriva de nuevos clones de células B *naïve*, puede implicar un cambio en la afinidad a través de los fenómenos de expansión clonal e hipermutación somática. Por tanto, puede ser que después de RTX se reduzca la posibilidad de que se formen suficientes clones de células B autorreactivas que se expanden y se diferencien en células secretoras de Ac.

Sin embargo, la colaboración del linfocito T en la producción de clones de células B que produzcan autoanticuerpos puede ser mayor en AR en comparación con PTT. Las células B en AR son potencialmente promiscuas, con especificidad por Fc, IgG o proteínas citrulinadas [43, 73, 196]. Por tanto hay más posibilidades de que el clon de células B autorreactivas se expanda en la AR.

Expresión de BAFF-R

El BAFF-R se expresa en la mayoría de las células B transicionales que salen de la MO [161], y aumenta hasta su máxima expresión (>99%) en las células B *naïve* maduras en sangre periférica. La expresión de BAFF-R en las subpoblaciones de células B antes del tratamiento con RTX fue similar en pacientes con AR y PTT, al igual que en CS, como se había descrito previamente en el estudio de 15 pacientes con AR activa estudiados antes del tratamiento con RTX [72] y se confirmó en un estudio más amplio en el que analizaron 208 pacientes con AR antes de recibir RTX [58].

De la Torre et al ya habían descrito una reducción de la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) en células B *naïve* y memoria definidas en base a la expresión de IgD/CD27, en pacientes con AR en recaída tras RTX. La expresión de BAFF-R fue menor en los pacientes con R-C, por lo que se concluyó que su recaída probablemente implicaba a nuevas células B autorreactivas, que eran capaces de superar el obstáculo de tener menores niveles de BAFF-R y por tanto una menor señalización a través de este sistema [72].

En el estudio actual se han analizado los 3 BBRs e incluido la subpoblación de plasmoblastos. Aunque se ha analizado tanto el porcentaje como la MFI de cada receptor, el estudio se ha centrado en el análisis de los porcentajes de expresión de cada receptor, pues se ha encontrado una menor variabilidad en los resultados en comparación con la expresión de MFI. Esta expresión puede cambiar según las condiciones del experimento o las fluctuaciones del láser, según el día en que se analizó la muestra.

En pacientes con AR se ha visto que, después de la administración de RTX, la proporción de células B *naïve* que expresan BAFF-R estaba reducida de forma significativa, especialmente en pacientes con R-C. En el estudio comparativo de pacientes con AR y PTT, la expresión de BAFF-R en el momento de la repoblación (porcentaje y MFI) estaba reducida notablemente en ambas enfermedades. Aunque el nivel de expresión aumentó progresivamente acorde al tiempo transcurrido desde la infusión de RTX en pacientes con PTT en remisión, no llegó a alcanzar los niveles vistos en los pacientes pre-RTX o los controles sanos, incluso después de más de 5 años de seguimiento.

Estos resultados son similares a los observados en el proceso de ontogenia, donde las células B *naïve* (habitualmente CD5+, esto es, células muy tempranas) expresan menos BAFF-R comparado con las células B de adultos [137]. En pacientes con deficiencia de BAFF-R, un subtipo de pacientes con CVID, se ve una reducción severa del número de células B maduras, pero un aumento en la proporción de células transicionales [158]. Esto refleja la necesidad de las células B *naïve* de señalizar a través de BAFF/BAFF-R para la supervivencia de la célula, a la vez que precisa una señal continua del BCR [133]. Una reducción parcial de la expresión de BAFF-R en células B *naïve* como la inducida por RTX, probablemente reduce el nivel de expresión de los marcadores anti-apoptóticos que se mantienen a través del receptor, y por tanto reduce la proporción de células que pueden seguir madurando.

Se ha sugerido que los niveles de BAFF elevados crónicamente producen una retroalimentación negativa sobre la expresión de BAFF-R, posiblemente por pérdida o internalización, independientemente de la exposición a agonistas de la célula B [138,

149]. Alternativamente, la expresión reducida de BAFF-R puede ser un fenómeno en relación con la repoblación periférica de células B, por el que las nuevas células B expresarían menos BAFF-R fisiológicamente, al igual que en neonatos pre-término [137].

Algunos pacientes con AR recaen a pesar de la baja expresión de BAFF-R, lo cual sugiere que superan la desventaja de una menor señalización a través de ese sistema, siguiendo otro mecanismo de recaída de la enfermedad [72]. Los pacientes con una R-D parecen necesitar una masa crítica de células B autorreactivas, y tendrían más tiempo para “normalizar” la expresión de sus BBR, por lo que su mecanismo de recaída parece seguir una vía más “normal” [183]. En estos pacientes, la maduración de las células *naïve* a células B memoria autorreactivas o células secretoras de Ac se produciría durante un tiempo variable hasta alcanzar una masa crítica de células, punto en el que se produce la recaída.

Expresión de BCMA

El papel de BCMA en el funcionamiento de la célula B sigue siendo confuso. BCMA se expresa de forma predominante en el aparato de Golgi [177], mientras que su expresión en la superficie de la célula en humanos es baja. Se expresa sobre todo en células plasmáticas, y se piensa que es esencial para la supervivencia de las células plasmáticas de vida media larga en la MO [178]. Su expresión aumenta en las células B maduras a la vez que se pierde la expresión de BAFF-R, coincidiendo con la diferenciación a células secretoras de Ac [139, 197]. El papel de este receptor adquiere su importancia en las células B malignas del MM, donde sí está presente en la superficie

celular, y puede contribuir al crecimiento y supervivencia de las células plasmáticas malignas [179]. También se ha visto un aumento en la expresión de BCMA en células de lupus en comparación con los CS [180-182], especialmente en plasmoblastos y células B memoria, pero también en células B transicionales, lo cual refleja probablemente un mayor grado de activación celular [180].

En este estudio, la expresión de BCMA (porcentaje y MFI) es similar entre los CS y todos los subgrupos de AR, a excepción de discretos aumentos en las subpoblaciones *memory resting* en pacientes post-RTX. En ambos grupos de pacientes post-RTX se observó una pequeña elevación en el porcentaje de plasmoblastos que expresaban BCMA, pero no fue estadísticamente significativa. Este aumento de BCMA en plasmoblastos apoyaría la idea de la activación de estas células que precipitan la recaída clínica.

Expresión de TACI

El papel de TACI en las respuestas de la célula B es muy complejo, con resultados opuestos dependiendo del contexto y condiciones. TACI se une preferentemente a oligómeros de BAFF y APRIL [198] y, en coordinación con la señalización a través de los TLR (sobre todo a través de la vía ERK/JNK), está implicado en la producción de IgM independiente de CD40 [168]. La ausencia de expresión de TACI produce una reducción en los niveles séricos de IgA e IgG, pero un aumento del número de células B, que se atribuye a la pérdida de señales inhibitorias hacia BAFF-R y CD40, que se producen cuando TACI se expresa normalmente. Se cree que TACI es esencial para el cambio de clase de Ig [173], y los defectos en la expresión

de TACI se han asociado a algunas formas de CVID y a la deficiencia de IgA [199]. Usando Ac agonistas, Sakurai et al mostraron que la estimulación de las células B con anti-BAFF-R y CD40L aumentaba la expresión de TACI. Los Ac frente a TACI reducían la producción de Ig [172].

Los resultados de este estudio muestran que el porcentaje de células TACI⁺ es significativamente menor en los subtipos de células B memoria de pacientes post-RTX en comparación con los CS. La MFI era más baja en el momento de la repoblación, pero solamente alcanzó significación estadística en las células B IgD⁺ *resting memory*. No está claro si esto refleja una ausencia de regulación positiva de TACI, o una reducción de éste por internalización o pérdida. Otra posibilidad es que se produzcan células B con menor respuesta a la señalización inhibidora de TACI, por lo que aumentaría la diferenciación de células post-CG a células secretoras de Ac.

Estudios de BBRs en enfermedades autoinmunes

Hay pocos estudios que hayan investigado la expresión de los BBRs en sangre periférica humana en distintas patologías.

El primer estudio se desarrolló en 2004, e investigaba las células plasmáticas malignas del MM. Los autores comunicaron que las células B de CS en sangre periférica, incluyendo las células *naïve*, memoria, y CD5⁺ expresan BAFF-R y TACI (que se expresa a niveles más altos en células CD27⁺), y no expresan BCMA o éste es muy bajo. Sin embargo, las células de mieloma tienen una expresión variable de BAFF-R, y expresan BCMA en la superficie de la célula, lo que sugiere un papel potencial de

este receptor para el crecimiento y supervivencia de las células plasmáticas malignas. También encuentran BAFF en secciones de MO de pacientes con MM, y describen que las células de MM pueden expresar BAFF, al contrario que las de CS. En resumen, sugieren que hay una expresión alterada de BAFF/BBRs que contribuye a una acumulación progresiva de las células plasmáticas malignas características del MM [179].

Varios estudios se han centrado en la expresión de BBRs en las células B de LES. Todos los estudios vieron una expresión reducida (MFI) de BAFF-R en las células de lupus comparado con los CS [149, 180-182]. Sin embargo, la mayor parte de estudios se centran en el dato de la MFI, y no describen el porcentaje de expresión de los BBRs. Tampoco aportan datos sobre tratamientos previos o concomitantes, que podrían influenciar los resultados si los pacientes han recibido tratamiento con RTX.

Carter et al describieron que la presencia de BAFF-R en la superficie de la célula no está reducida, pero el BAFF-R disponible para su unión a BAFF está reducido, por ocupación previa de BAFF. Concluían que las células B de pacientes con LES responden en menor medida a BAFF exógeno, lo cual coincide con los niveles reducidos de receptores disponibles en la superficie de la célula. De acuerdo con estos resultados, la ocupación de BAFF-R puede contribuir a los mecanismos de la enfermedad, y servir como biomarcador de actividad de la enfermedad. Por esto, los agentes que bloquean BAFF precisarían también superar la unión persistente de BAFF a BAFF-R [200].

Sellam et al describieron una expresión reducida de BAFF-R (MFI) en células B en sangre periférica de pacientes SS primario y LES en comparación con CS. Ninguno de estos pacientes había recibido terapia de depleción de células B. Además señalaban que la población completa de células B periféricas expresa BAFF-R, por lo que el porcentaje de células que expresan BAFF-R no estaba alterado. Describieron una correlación negativa entre los niveles séricos de BAFF y la expresión de BAFF-R en las células B, sugiriendo que la elevación crónica de BAFF puede reducir la expresión de BAFF-R en la superficie de la célula a través de una regulación post-transcripcional [149].

Un estudio de 2010 de Zhao et al encontró niveles más altos de BAFF sérico y una reducción de la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) en pacientes con LES al inicio de su enfermedad, explicando esa reducción de BAFF-R por un aumento de su ocupación por elevación de BAFF. Se encontró una fuerte correlación negativa entre BAFF y la expresión de BAFF-R en células B. La expresión de TACI y BCMA estaba aumentadas en células B periféricas de pacientes con nefritis lúpica [182]. En este estudio sin embargo no se aportaba información sobre el tratamiento previo y concomitante recibido.

Koarada et al también describieron un descenso de la MFI de BAFF-R y un aumento de la MFI de BCMA en células B RP105- (CD180-), un subtipo de células pre-plasmáticas, en comparación con CS [181].

Un estudio posterior de Kim et al describió nuevamente una MFI de BAFF-R reducida en células de lupus, además de un aumento de la MFI de BCMA en

plasmoblastos, células B memoria y transicionales, que probablemente refleja un mayor grado de activación celular [180].

Niveles de BAFF

Los niveles de BAFF sérico en pacientes con AR pre-RTX eran similares a los CS, como se ha visto en estudios previos [58, 71, 72]. En el momento de la recaída tras la repoblación periférica de células B en pacientes post-RTX, los niveles de BAFF sérico fueron muy variables, pero estaban significativamente elevados en ambos grupos post-RTX en comparación con los controles sanos.

En el estudio comparativo de AR y PTT, los niveles de BAFF sérico eran normales en pacientes con PTT previos al inicio de RTX. Se ha descrito una elevación de BAFF sérico en pacientes con PTT aguda, pero los niveles de BAFF pudieron normalizarse por el tratamiento con esteroides que los pacientes ya habían recibido en el momento de la recogida de las muestras. Los niveles de BAFF sérico estaban elevados en el momento de la repoblación periférica, y se habían reducido en pacientes en remisión.

Correlación entre la expresión de BAFF-R y los niveles de BAFF

En el estudio de AR, la correlación entre los niveles séricos de BAFF y el porcentaje de células B *naïve* transicionales, maduras y memoria BAFF-R+ fue muy evidente. Este hecho sugiere que los niveles elevados de BAFF en pacientes con AR post-RTX son importantes en la supervivencia de la célula B y la reconstitución del

pool de células B periféricas. No se identificó ninguna correlación BAFF-BAFF-R en plasmoblastos, pues BAFF-R se pierde antes de la etapa de plasmoblasto, promoviendo la diferenciación del linfocito a célula secretora de Ig [197], pero no la activación celular [139].

En el estudio de PTT, se vio una fuerte asociación negativa entre las concentraciones de BAFF sérico y la expresión de BAFF-R (porcentaje y MFI) en pacientes en remisión. Esto sugiere que en los pacientes tratados con RTX, uno de los factores importantes en la expresión reducida de BAFF-R (particularmente la MFI) es una correlación negativa con los niveles de BAFF. Se ha demostrado *in vitro* que los niveles elevados de BAFF en suero normal pueden modular la expresión de BAFF-R en ausencia de señalización productiva de NFkB [139]. En este estudio se vio que en pacientes con PTT en remisión, los niveles de BAFF sérico estaban inversamente correlacionados con la expresión de BAFF-R, pero no con el número de células CD19+, incluso en pacientes con niveles normales de BAFF sérico.

La unión de BAFF a BAFF-R es necesaria para la supervivencia de la célula B, y en ratones está relacionada con la señalización productiva a través de NFkB [201]. *In vitro*, se ha visto que BAFF exógeno puede reducir la expresión de BAFF-R por internalización o pérdida de BAFF-R [149]. En otros experimentos, se ha visto que BAFF puede aumentar la diferenciación T-dependiente (CD40L+IL2, IL4, IL10) a célula plasmática, y aumentar el fenotipo CD27^{alto} BCMA+. Sin embargo, si se añade BAFF a experimentos en los que se haya estimulado la vía T-independiente usando CpG, IL2 e IL15, se inhibe la producción de Ig [139]. En CS, las células B transicionales no se diferencian a células secretoras de Ac cuando se estimulan a través

de su BCR, incluso en presencia de coestimulación T-dependiente y T-independiente. Esto reflejaría un mecanismo negativo de tolerancia para impedir que las células B *naïve* se activen a través de Ag solubles.

El porcentaje reducido de células B *naïve* BAFF-R+ podría producir menos células B viables capaces de entrar en el pool de células B foliculares o de CG. Sin embargo, en AR, gran parte de las células que salen de la MO tienen un BCR autorreactivo, por lo que podrían superar el control de células autorreactivas gracias a una señalización inapropiadamente positiva a través de su BCR [11, 67, 202]. Esto puede producir una rápida diferenciación de la célula B a célula secretora de Ac, que es lo que parece ocurrir en los pacientes con una R-C.

Asimismo, es posible que los niveles elevados de BAFF aumenten la competición por la supervivencia entre células normales y autorreactivas. La selección que se produce en el *pool* de células post-CG puede estar determinada por la especificidad del BCR. Por esto, es posible que la expansión y maduración a células plasmáticas de ciertos clones de células B autorreactivas con ventajas para su supervivencia (como las células B FR+) pueda favorecerse en estas condiciones [203]. Las células B autorreactivas son “promiscuas”, pudiendo obtener ayuda de células T con una variedad de especificidades [43]. Así, se podría producir su selección y expansión preferencial sobre las células B normales, hasta llegar a un nivel crítico para la recaída de la enfermedad.

Correlación entre la expresión de BAFF-R y el tiempo transcurrido desde la repoblación o inicio de RTX

En el estudio de AR, hay una clara correlación entre el tiempo transcurrido desde la repoblación de células B y la expresión de BAFF-R, con significación estadística para la expresión del receptor (porcentaje y MFI) en células B transicionales y post-CG, y en para el porcentaje de células B maduras BAFF-R+.

Los resultados analizados en pacientes con PTT en remisión con un ciclo de RTX también muestran que el porcentaje de células que expresan BAFF-R aumenta gradualmente con el tiempo transcurrido desde el tratamiento. Los estudios de repoblación periférica en esos pacientes no estaban disponibles, por lo que no se ha podido hacer una comparación similar a la de pacientes con AR. En los pacientes con PTT en remisión por RTX, la MFI de BAFF-R continuaba reducida años después del tratamiento.

La expresión de los BBRs después de la depleción terapéutica de linfocitos B es similar a la vista en el proceso de ontogenia, con una reducción de la expresión de BBRs durante la repoblación, al igual que se ve en células B neonatales del estudio de Kaur et al. Esto se traduce en diferencias funcionales, que se ven en la proliferación reducida de células B tras estimulación con BAFF recombinante y anti-IgM [137]. La hipótesis actual es que en el momento de la repoblación se produciría una situación similar al proceso de ontogenia inicial de células B.

De hecho, los hallazgos del estudio de PTT pueden contribuir a los mecanismos que intentan explicar el retraso en la recaída de la enfermedad en algunos pacientes que reciben RTX. Parece que RTX depleciona una gran proporción de células B maduras, y que las células B *naïve* producidas presentan una reducción marcada de BAFF-R, inversamente relacionada con los niveles de BAFF sérico. La expansión de células B con un número bajo de BAFF-R en un ambiente muy rico en BAFF parece tener un efecto negativo en la expresión de BAFF-R.

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones del estudio son inherentes a los estudios retrospectivos y transversales o se relacionan con el tamaño de las muestras. En el estudio de la cohorte de pacientes con AR de UCL se ha empleado el criterio de recaída clínica utilizado en ese centro, en el que no suelen aplicarse los estándares de control de la enfermedad mediante DAS-28, por lo que el estudio no es extrapolable a los datos de otros centros.

El número de pacientes incluidos en los estudios experimentales es bajo, dada la dificultad para conseguir pacientes con las características necesarias. Hay pocos pacientes disponibles en los estudios con PTT, especialmente en caso de la PTT aguda. Además, los datos de repoblación en los pacientes con PTT en remisión eran incompletos, pues el protocolo de tratamiento del Servicio de Hematología no incluía la determinación de células CD19+ u otros datos.

Los resultados de TACI en pacientes con AR tratados con RTX son poco valorables, pues el número de células B memoria permanece reducido durante mucho tiempo tras el tratamiento, por lo que el cálculo de TACI es difícil en este tipo de experimento. Asimismo, BCMA es un receptor de predominio en células plasmáticas y no en células B presentes en sangre periférica, por lo que el cálculo de este receptor en sangre periférica tiene un valor limitado, con resultados poco concluyentes.

El estudio comparativo entre los pacientes con AR y PTT en el momento de la repoblación utiliza muestras frescas en el caso de los pacientes con AR, pero congeladas en pacientes con PTT, dada la imposibilidad de conseguir muestras en fresco de esos pacientes. La congelación no alteraría los resultados de las subpoblaciones de linfocitos B o el % de células BAFF-R+, pero puede alterar las determinaciones de MFI, por lo que el estudio no se ha centrado en ese parámetro.

Finalmente, cuando se ha revisado la literatura disponible, la mayoría de autores aportan datos sobre la MFI de los BBRs, pero no el porcentaje de expresión, lo que hizo difícil comparar los resultados de este estudio con otros publicados, dificultando la interpretación de los datos. Este estudio se ha centrado en el porcentaje de expresión de los distintos receptores, pues los resultados son menos variables que los de la MFI.

CONCLUSIONES

- Hay dos patrones de recaída en AR después de la repoblación de células B en sangre periférica en pacientes tratados con RTX, con una frecuencia mayor de R-C (70% de los pacientes) en este estudio.
- El esquema de tratamiento para pacientes con AR en terapia con RTX se basaría inicialmente en una estrategia “treat-to-target” para alcanzar la remisión o una actividad baja de la enfermedad. Pueden administrarse hasta tres ciclos consecutivos a intervalos de 6 meses en pacientes con actividad inflamatoria persistente, pues la depleción en tejidos es más lenta. Una vez que se alcanza la remisión, los ciclos sucesivos deberían administrarse en cuanto haya síntomas o alteraciones analíticas como aumento de la PCR o de los títulos de autoanticuerpos, que sugieran una mayor actividad de la enfermedad. Los ciclos sucesivos deberían administrarse de forma preventiva de acuerdo con la duración del ciclo previo, tratando a los pacientes habitualmente un mes antes del tiempo calculado para la recaída.
- La monitorización de la depleción y repoblación de células B mediante citometría de flujo de alta resolución es útil para identificar la duración de la respuesta del paciente al ciclo de tratamiento, y con ello poder predecir recaídas futuras. Es un procedimiento que puede estandarizarse en la práctica clínica habitual. Si esta estrategia se aplica, los eventos adversos secundarios y el coste de la terapia pueden reducirse considerablemente.

- La repoblación de células B tras RTX en pacientes con AR y PTT sigue un patrón similar al proceso de ontogenia, con una mayor frecuencia de células B *naïve*, y una regeneración reducida de células memoria. El estudio de los pacientes con PTT en remisión permite un análisis más completo de los cambios que RTX produce en las subpoblaciones de células B a largo plazo, pues los pacientes suelen permanecer en remisión tras un solo ciclo de RTX, al contrario que los pacientes con AR.
- La expresión de BAFF-R es menor en el momento de la repoblación de células B, tanto en AR (pacientes con R-C) como en PTT, y tiende a aumentar con el tiempo transcurrido desde la repoblación (pacientes con R-D o PTT en remisión), al igual que en el proceso de ontogenia, pero no alcanza los valores vistos en pacientes no tratados con RTX. Los resultados de la expresión de TACI y BCMA en pacientes con AR pre y post-RTX no aportan datos adicionales.
- El mecanismo de recaída en pacientes con R-C parece independiente del sistema BAFF/BBR, pues las células tempranas (transicionales) tendrían una expresión reducida de BAFF-R, que sería insuficiente para unirse a los niveles elevados de BAFF. En este subgrupo tendrían más importancia otros factores no relacionados con las células B.
- Los pacientes con AR con una recaída meses después de la repoblación periférica de células B (R-D) probablemente precisen un número crítico de células B autorreactivas para recaer, y tendrían más tiempo para que la expresión de sus BBRs aumente, por lo que su mecanismo de recaída seguiría una vía más “normal”.

- RTX produce cambios en el fenotipo de células B y la expresión de BAFF-R que siguen presentes años después de un solo ciclo de tratamiento, como se ha visto en pacientes con PTT en remisión. El hecho de que persista un alto porcentaje de células B *naïve* años después de RTX, junto con un porcentaje reducido de células B memoria puede contribuir al retraso en la recaída de la enfermedad visto en pacientes con PTT, y probablemente en pacientes con AR con R-D.
- La monitorización de las diferentes subpoblaciones de células B y la expresión de BAFF-R en pacientes tratados con RTX podría servir para monitorizar factores que se asocien a la remisión prolongada, como la de los pacientes con PTT o los pacientes con AR con R-D.
- Aunque han podido identificarse diferencias en la expresión de BBRs en pacientes con R-C y R-D, la monitorización de los niveles de BAFF y la expresión de BBRs no es concluyente para predecir el tipo de recaída del paciente con AR tratado con RTX, por lo que no puede sugerirse su realización en la práctica clínica habitual.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW: Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376(9746), 1094-1108 (2010).
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.*: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31(3), 315-324 (1988).
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ *et al.*: 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69(9), 1580-1588 (2010).
4. Gomez A: [New criteria for the classification of rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin* 6S3, S33-37 (2011).
5. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR *et al.*: Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*, (2015).
6. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC *et al.*: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73(3), 492-509 (2014).
7. Rantapaa-Dahlqvist S, De Jong BA, Berglin E *et al.*: Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(10), 2741-2749 (2003).
8. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM: Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 97(2), 188-196 (1999).
9. Nemazee D, Buerki K: Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20), 8039-8043 (1989).
10. Fulcher DA, Basten A: Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med* 179(1), 125-134 (1994).
11. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E: Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 201(10), 1659-1667 (2005).
12. Leandro MJ: B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res Ther* 15 Suppl 1, S3 (2013).
13. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R: Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188(9), 1679-1689 (1998).
14. Fecteau JF, Cote G, Neron S: A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177(6), 3728-3736 (2006).
15. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V *et al.*: Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118(8), 2150-2158 (2011).
16. Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM: Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center

- founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 167(7), 3610-3618 (2001).
17. Odegard VH, Schatz DG: Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6(8), 573-583 (2006).
 18. Chaudhuri J, Alt FW: Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4(7), 541-552 (2004).
 19. Weill JC, Weller S, Reynaud CA: Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 27, 267-285 (2009).
 20. MacLennan IC: Germinal centers. *Annual review of immunology* 12, 117-139 (1994).
 21. Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM: T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7(3), 349-354 (1995).
 22. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA *et al.*: B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol* 165(5), 2474-2480 (2000).
 23. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH: B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22(3), 307-315 (2010).
 24. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM: T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167(8), 4710-4718 (2001).
 25. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ *et al.*: IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15(10), 3266-3274 (1997).
 26. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA *et al.*: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90(6), 2188-2195 (1997).
 27. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ: The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8, 140-174 (2005).
 28. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP: Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44(16), 3823-3837 (2007).
 29. Reff ME, Carner K, Chambers KS *et al.*: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83(2), 435-445 (1994).
 30. Leandro MJ, Cooper N, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Bone marrow B-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy. *Rheumatology (Oxford)* 46(1), 29-36 (2007).
 31. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 63(6), 1424-1433 (1984).
 32. Teng YK, Wheeler G, Hogan VE *et al.*: Induction of long-term B-cell depletion in refractory rheumatoid arthritis patients preferentially affects autoreactive more than protective humoral immunity. *Arthritis Res Ther* 14(2), R57 (2012).
 33. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J *et al.*: Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25), 2572-2581 (2004).

34. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 12(4), 387-398 (1993).
35. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C *et al.*: B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27⁺ B cells. *Exp Hematol* 33(4), 480-486 (2005).
36. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K: Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol* 167(1), 15-25 (2012).
37. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(2), 613-620 (2006).
38. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP: Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(8), 2377-2386 (2006).
39. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B *et al.*: B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol* 122(2), 139-145 (2007).
40. Anolik JH, Barnard J, Owen T *et al.*: Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 56(9), 3044-3056 (2007).
41. Thurlings RM, Teng O, Vos K *et al.*: Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(2), 409-412 (2010).
42. Reddy V, Croca S, Gerona D *et al.*: Serum rituximab levels and efficiency of B cell depletion: differences between patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 52(5), 951-952 (2013).
43. Roosnek E, Lanzavecchia A: Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 173(2), 487-489 (1991).
44. Edwards JC, Cambridge G: Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 40(2), 205-211 (2001).
45. Van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd *et al.*: Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis* 72(9), 1496-1502 (2013).
46. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW *et al.*: Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 54(9), 2793-2806 (2006).
47. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A *et al.*: The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 54(5), 1390-1400 (2006).

48. Rubbert-Roth A, Tak PP, Zerbini C *et al.*: Efficacy and safety of various repeat treatment dosing regimens of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: results of a Phase III randomized study (MIRROR). *Rheumatology (Oxford)* 49(9), 1683-1693 (2010).
49. Emery P, Deodhar A, Rigby WF *et al.*: Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis* 69(9), 1629-1635 (2010).
50. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N *et al.*: Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70(6), 909-920 (2011).
51. Boumans MJ, Thurlings RM, Gerlag DM, Vos K, Tak PP: Response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis in different compartments of the immune system. *Arthritis Rheum* 63(11), 3187-3194 (2011).
52. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S *et al.*: B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis Rheum* 63(4), 933-938 (2011).
53. Roll P, Dorner T, Tony HP: Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 58(6), 1566-1575 (2008).
54. Vital EM, Rawstron AC, Dass S *et al.*: Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis Rheum* 63(3), 603-608 (2011).
55. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P: Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(10), 2993-2999 (2008).
56. Vital EM, Dass S, Rawstron AC *et al.*: Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis Rheum* 62(5), 1273-1279 (2010).
57. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D *et al.*: B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 50(8), 2580-2589 (2004).
58. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H *et al.*: Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63(12), 3692-3701 (2011).
59. Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K *et al.*: Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in *Macaca fascicularis*. *J Immunother* 28(3), 212-219 (2005).
60. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, Bokarewa MI, Brisslert M: Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11(4), R123 (2009).
61. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P *et al.*: Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 11(4), R131 (2009).

62. Kamburova EG, Koenen HJ, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I: In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant* 12(2), 341-350 (2012).
63. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC *et al.*: Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(8), 2146-2154 (2003).
64. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JCW: Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 46(4), 626-630 (2007).
65. Moller B, Aeberli D, Eggli S *et al.*: Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11(3), R62 (2009).
66. Van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd *et al.*: Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol* 37(3), 558-567 (2010).
67. De La Torre I, Leandro MJ, Valor L, Becerra E, Edwards JC, Cambridge G: Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. *Rheumatology (Oxford)*, (2012).
68. Becerra E, Cambridge G, De La Torre I, Leandro Mj: Long-term safety of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol.* 7(4), 383-390 (2012).
69. Gong Q, Ou Q, Ye S *et al.*: Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174(2), 817-826 (2005).
70. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP: Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 67(7), 917-925 (2008).
71. Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC: Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 54(3), 723-732 (2006).
72. De La Torre I, Moura RA, Leandro MJ, Edwards J, Cambridge G: B-cell-activating factor receptor expression on naive and memory B cells: relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following B-cell depletion therapy. *Ann Rheum Dis* 69(12), 2181-2188 (2010).
73. Cambridge G, Perry HC, Nogueira L *et al.*: The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J Autoimmun* 50, 67-76 (2014).
74. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G: Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 61(10), 883-888 (2002).
75. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC: Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 46(4), 626-630 (2007).

76. Leandro MJ, Becerra-Fernandez E: B-cell therapies in established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25(4), 535-548 (2011).
77. Mease PJ, Cohen S, Gaylis NB *et al.*: Efficacy and safety of retreatment in patients with rheumatoid arthritis with previous inadequate response to tumor necrosis factor inhibitors: results from the SUNRISE trial. *J Rheumatol* 37(5), 917-927 (2010).
78. Keystone E, Fleischmann R, Emery P *et al.*: Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum* 56(12), 3896-3908 (2007).
79. De La Torre I, Leandro M, Gerona D, Valor L, Carreno L and Cambridge G: Impact of non-fixed versus 6 month fixed retreatment schedules on serum immunoglobulins following rituximab in patients with rheumatoid arthritis *J Clin Cell Immunol S6: 005.*, (2013).
80. Mukhtyar C, Flossmann O, Hellmich B *et al.*: Outcomes from studies of antineutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis: a systematic review by the European League Against Rheumatism systemic vasculitis task force. *Ann Rheum Dis* 67(7), 1004-1010 (2008).
81. Smith KG, Jones RB, Burns SM, Jayne DR: Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 54(9), 2970-2982 (2006).
82. Jones RB, Ferraro AJ, Chaudhry AN *et al.*: A multicenter survey of rituximab therapy for refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 60(7), 2156-2168 (2009).
83. Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U: Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am J Respir Crit Care Med* 173(2), 180-187 (2006).
84. Stone JH, Merkel PA, Spiera R *et al.*: Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 363(3), 221-232 (2010).
85. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T *et al.*: Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 363(3), 211-220 (2010).
86. Calvo-Alen J, Silva-Fernandez L, Ucar-Angulo E *et al.*: SER consensus statement on the use of biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Reumatol Clin* 9(5), 281-296 (2013).
87. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ: The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 169, 107-121 (1999).
88. Furie R, Petri M, Zamani O *et al.*: A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63(12), 3918-3930 (2011).
89. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA: An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46(10), 2673-2677 (2002).
90. Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA: B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)* 44(12), 1542-1545 (2005).

91. Ng KP, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Cambridge G, Isenberg DA: Repeated B cell depletion in treatment of refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65(7), 942-945 (2006).
92. Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M *et al.*: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 54(11), 3612-3622 (2006).
93. Ng KP, Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein M, Isenberg DA: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 66(9), 1259-1262 (2007).
94. Lu TY, Ng KP, Cambridge G *et al.*: A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London Hospital: the first fifty patients. *Arthritis Rheum* 61(4), 482-487 (2009).
95. Edwards JC, Cambridge G, Leandro MJ: B cell depletion therapy in rheumatic disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(5), 915-928 (2006).
96. Sfikakis PP, Boletis JN, Tsokos GC: Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol* 17(5), 550-557 (2005).
97. Jonsdottir T, Gunnarsson I, Risselada A, Henriksson EW, Klareskog L, Van Vollenhoven RF: Treatment of refractory SLE with rituximab plus cyclophosphamide: clinical effects, serological changes, and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 67(3), 330-334 (2008).
98. Terrier B, Amoura Z, Ravaud P *et al.*: Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum* 62(8), 2458-2466 (2010).
99. Iaccarino L, Bartoloni E, Carli L *et al.*: Efficacy and safety of off-label use of rituximab in refractory lupus: data from the Italian Multicentre Registry. *Clin Exp Rheumatol* 33(4), 449-456 (2015).
100. Fernandez-Nebro A, De La Fuente JL, Carreno L *et al.*: Multicenter longitudinal study of B-lymphocyte depletion in refractory systemic lupus erythematosus: the LESIMAB study. *Lupus* 21(10), 1063-1076 (2012).
101. Pepper R, Griffith M, Kirwan C *et al.*: Rituximab is an effective treatment for lupus nephritis and allows a reduction in maintenance steroids. *Nephrol Dial Transplant* 24(12), 3717-3723 (2009).
102. Diaz-Lagares C, Croca S, Sangle S *et al.*: Efficacy of rituximab in 164 patients with biopsy-proven lupus nephritis: pooled data from European cohorts. *Autoimmun Rev* 11(5), 357-364 (2012).
103. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ *et al.*: Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum* 62(1), 222-233 (2010).
104. Rovin BH, Furie R, Latinis K *et al.*: Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum* 64(4), 1215-1226 (2012).
105. Kroese FG, Abdulahad WH, Haacke E, Bos NA, Vissink A, Bootsma H: B-cell hyperactivity in primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 10(4), 483-499 (2014).

106. Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J *et al.*: Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 57(2), 310-317 (2007).
107. Dass S, Bowman SJ, Vital EM *et al.*: Reduction of fatigue in Sjogren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann Rheum Dis* 67(11), 1541-1544 (2008).
108. Gottenberg JE, Cinquetti G, Larroche C *et al.*: Efficacy of rituximab in systemic manifestations of primary Sjogren's syndrome: results in 78 patients of the AutoImmune and Rituximab registry. *Ann Rheum Dis* 72(6), 1026-1031 (2013).
109. Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S *et al.*: Treatment of primary Sjogren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 160(4), 233-242 (2014).
110. Brown S, Navarro Coy N, Pitzalis C *et al.*: The TRACTISS protocol: a randomised double blind placebo controlled clinical trial of anti-B-cell therapy in patients with primary Sjogren's Syndrome. *BMC Musculoskelet Disord* 15, 21 (2014).
111. Dalakas MC, Hohlfield R: Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362(9388), 971-982 (2003).
112. Lambotte O, Kotb R, Maigne G, Blanc FX, Goujard C, Delfraissy JF: Efficacy of rituximab in refractory polymyositis. *J Rheumatol* 32(7), 1369-1370 (2005).
113. Mok CC, Ho LY, To CH: Rituximab for refractory polymyositis: an open-label prospective study. *J Rheumatol* 34(9), 1864-1868 (2007).
114. Majmudar S, Hall HA, Zimmermann B: Treatment of adult inflammatory myositis with rituximab: an emerging therapy for refractory patients. *J Clin Rheumatol* 15(7), 338-340 (2009).
115. Munoz-Beamud F, Isenberg DA: Rituximab as an effective alternative therapy in refractory idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol* 31(6), 896-903 (2013).
116. Oddis CV, Reed AM, Aggarwal R *et al.*: Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum* 65(2), 314-324 (2013).
117. Scully M, McDonald V, Cavenagh J *et al.*: A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 118(7), 1746-1753 (2011).
118. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 89(9), 3097-3103 (1997).
119. Furlan M, Robles R, Galbusera M *et al.*: von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 339(22), 1578-1584 (1998).
120. Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheifflinger F: IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 7(10), 1703-1710 (2009).
121. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S *et al.*: Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* 158(3), 323-335 (2012).

122. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA: Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 8(6), 1201-1208 (2010).
123. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 98(4), 952-957 (2001).
124. Heidel F, Lipka DB, Von Auer C, Huber C, Scharrer I, Hess G: Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. *Thromb Haemost* 97(2), 228-233 (2007).
125. Scully M, Cohen H, Cavenagh J *et al.*: Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol* 136(3), 451-461 (2007).
126. Froissart A, Buffet M, Veyradier A *et al.*: Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med* 40(1), 104-111 (2012).
127. Westwood JP, Webster H, McGuckin S, McDonald V, Machin SJ, Scully M: Rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura: benefit of early administration during acute episodes and use of prophylaxis to prevent relapse. *J Thromb Haemost* 11(3), 481-490 (2013).
128. Scully M: Rituximab in the treatment of TTP. *Hematology* 17 Suppl 1, S22-24 (2012).
129. Moore PA, Belvedere O, Orr A *et al.*: BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285(5425), 260-263 (1999).
130. Schneider P, Mackay F, Steiner V *et al.*: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189(11), 1747-1756 (1999).
131. Bossen C, Schneider P: BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18(5), 263-275 (2006).
132. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J: BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annual review of immunology* 21, 231-264 (2003).
133. Mackay F, Schneider P: Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9(7), 491-502 (2009).
134. Day ES, Cachero TG, Qian F *et al.*: Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 44(6), 1919-1931 (2005).
135. Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A: Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol* 10(13), 785-788 (2000).
136. Salzer U, Jennings S, Grimbacher B: To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. *Eur J Immunol* 37(1), 17-20 (2007).
137. Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR: Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 110(8), 2948-2954 (2007).

138. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U *et al.*: Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol* 188(1), 497-503 (2012).
139. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF: Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179(11), 7276-7286 (2007).
140. Bishop GA, Hostager BS, Brown KD: Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 72(1), 19-23 (2002).
141. Bishop GA: The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol* 4(10), 775-786 (2004).
142. Ni CZ, Oganessian G, Welsh K *et al.*: Key molecular contacts promote recognition of the BAFF receptor by TNF receptor-associated factor 3: implications for intracellular signaling regulation. *J Immunol* 173(12), 7394-7400 (2004).
143. Miller JP, Stadanlick JE, Cancro MP: Space, selection, and surveillance: setting boundaries with BLyS. *J Immunol* 176(11), 6405-6410 (2006).
144. Cancro MP, D'cruz DP, Khamashta MA: The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 119(5), 1066-1073 (2009).
145. Cancro MP: The BLyS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation. *Immunol Rev* 202, 237-249 (2004).
146. Thien M, Phan TG, Gardam S *et al.*: Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20(6), 785-798 (2004).
147. Hondowicz BD, Alexander ST, Quinn WJ, 3rd *et al.*: The role of BLyS/BLyS receptors in anti-chromatin B cell regulation. *Int Immunol* 19(4), 465-475 (2007).
148. Cancro MP: Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat Rev Immunol* 9(9), 657-661 (2009).
149. Sellam J, Miceli-Richard C, Gottenberg JE *et al.*: Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 66(6), 790-797 (2007).
150. Thomas MR, Machin SJ, Mackie I, Scully MA: B cell activating factor is elevated in acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 155(5), 620-622 (2011).
151. Darce JR, Arendt BK, Chang SK, Jelinek DF: Divergent effects of BAFF on human memory B cell differentiation into Ig-secreting cells. *J Immunol* 178(9), 5612-5622 (2007).
152. Goenka R, Scholz JL, Sindhava VJ, Cancro MP: New roles for the BLyS/BAFF family in antigen-experienced B cell niches. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(2), 107-113 (2014).
153. Goenka R, Matthews AH, Zhang B *et al.*: Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med* 211(1), 45-56 (2014).
154. Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC *et al.*: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte

- stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis* 67(7), 1011-1016 (2008).
155. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X: Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 66(5), 700-703 (2007).
 156. Ng LG, Sutherland AP, Newton R *et al.*: B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173(2), 807-817 (2004).
 157. Yan M, Brady JR, Chan B *et al.*: Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11(19), 1547-1552 (2001).
 158. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M *et al.*: B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33), 13945-13950 (2009).
 159. Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM: BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human pathology* 36(10), 1113-1119 (2005).
 160. Hardy RR, Hayakawa K: B cell development pathways. *Annual review of immunology* 19, 595-621 (2001).
 161. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE: Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105(11), 4390-4398 (2005).
 162. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H: Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity* 26(2), 205-213 (2007).
 163. Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP: Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 168(12), 5993-5996 (2002).
 164. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ *et al.*: Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 280(8), 7218-7227 (2005).
 165. Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD *et al.*: BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* 169(8), 4314-4321 (2002).
 166. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE: Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology* 26, 261-292 (2008).
 167. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM *et al.*: DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3(9), 822-829 (2002).
 168. Pan-Hammarstrom Q, Salzer U, Du L *et al.*: Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet* 39(4), 429-430 (2007).
 169. He B, Santamaria R, Xu W *et al.*: The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* 11(9), 836-845 (2010).
 170. Castigli E, Wilson SA, Scott S *et al.*: TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201(1), 35-39 (2005).

171. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS: Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory B_{LYS} receptor. *Immunity* 18(2), 279-288 (2003).
172. Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T: TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol* 37(1), 110-118 (2007).
173. Sakurai D, Hase H, Kanno Y, Kojima H, Okumura K, Kobata T: TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* 109(7), 2961-2967 (2007).
174. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L *et al.*: TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 37(8), 829-834 (2005).
175. Salzer U, Chapel HM, Webster AD *et al.*: Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 37(8), 820-828 (2005).
176. Castigli E, Wilson SA, Elkhail A, Ozcan E, Garibyan L, Geha RS: Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 120(4), 885-891 (2007).
177. Gras MP, Laabi Y, Linares-Cruz G *et al.*: BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *Int Immunol* 7(7), 1093-1106 (1995).
178. O'connor BP, Raman VS, Erickson LD *et al.*: BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199(1), 91-98 (2004).
179. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK *et al.*: Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103(2), 689-694 (2004).
180. Kim J, Gross JA, Dillon SR, Min JK, Elkon KB: Increased BCMA expression in lupus marks activated B cells, and BCMA receptor engagement enhances the response to TLR9 stimulation. *Autoimmunity* 44(2), 69-81 (2011).
181. Koarada S, Tada Y, Sohma Y *et al.*: Autoantibody-producing RP105(-) B cells, from patients with systemic lupus erythematosus, showed more preferential expression of BCMA compared with BAFF-R than normal subjects. *Rheumatology (Oxford)* 49(4), 662-670 (2010).
182. Zhao LD, Li Y, Smith MF, Jr. *et al.*: Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus* 19(13), 1534-1549 (2010).
183. Leandro MJ, Cambridge G: Expression of B cell activating factor (BAFF) and BAFF-binding receptors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 40(8), 1247-1250 (2013).
184. Edwards JC, Cambridge G, Leandro MJ: Repeated B-cell depletion in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 46(9), 1509 (2007).
185. Blanco F.J. Cañete, JD, Pablos J.L.: Técnicas de investigación básica en reumatología. 2, 43-54 (2005).
186. Schaffer AA, Pfannstiel J, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L, Grimbacher B: Analysis of families with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency suggests linkage of CVID to chromosome 16q. *Hum Genet* 118(6), 725-729 (2006).

187. Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK: The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* 2, 81 (2011).
188. Quartuccio L, Di Bidino R, Ruggeri M *et al.*: Cost-effectiveness analysis of two Rituximab retreatment regimens for longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, (2015).
189. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G: B lymphocyte depletion therapy with rituximab in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 30(2), 393-403, viii (2004).
190. Emery P, Mease PJ, Rubbert-Roth A *et al.*: Retreatment with rituximab based on a treatment-to-target approach provides better disease control than treatment as needed in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective pooled analysis. *Rheumatology (Oxford)* 50(12), 2223-2232 (2011).
191. Smith V, Van Praet JT, Vandooren B *et al.*: Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: an open-label clinical and histopathological study. *Ann Rheum Dis* 69(1), 193-197 (2010).
192. Dudler J, Finckh A, Kyburz D *et al.*: Swiss consensus statement: Recommendations for optimising re-treatment with MabThera (rituximab) in rheumatoid arthritis. *Swiss Med Wkly* 140, w13073 (2010).
193. Reiche BE, Ohrndorf S, Feist E, Messerschmidt J, Burmester GR, Backhaus M: Usefulness of power Doppler ultrasound for prediction of re-therapy with rituximab in rheumatoid arthritis: a prospective study of longstanding rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 66(2), 204-216 (2014).
194. Muhammad K, Roll P, Einsele H, Dorner T, Tony HP: Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 60(8), 2284-2293 (2009).
195. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y: Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, (2013).
196. Ireland JM, Unanue ER: Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system. *Autophagy* 8(3), 429-430 (2012).
197. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI *et al.*: BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112(2), 286-297 (2003).
198. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A *et al.*: TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 111(3), 1004-1012 (2008).
199. Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA: TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 6(5), 357-362 (2006).
200. Carter RH, Zhao H, Liu X *et al.*: Expression and occupancy of BAFF-R on B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52(12), 3943-3954 (2005).
201. Cancro MP: Living in context with the survival factor BAFF. *Immunity* 28(3), 300-301 (2008).

202. Rudnicka W, Burakowski T, Warnawin E *et al.*: Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 39(5), 1211-1220 (2009).
203. Edwards JC, Cambridge G: B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 6(5), 394-403 (2006).

**RHEUMATOID ARTHRITIS AND B CELL DEPLETION
THERAPY: RELATIONSHIPS BETWEEN EXPRESSION
OF B-CELL ACTIVATING FACTOR BINDING
RECEPTORS AND PATTERNS OF CLINICAL RELAPSE**

INDEX

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS.....	178
SUMMARY.....	181
INTRODUCTION.....	187
Rheumatoid Arthritis.....	187
B cell subpopulations.....	190
B cell depletion therapy based on Rituximab®.....	197
B cells, Rituximab and Rheumatoid Arthritis.....	200
B cell studies in RA.....	201
Experience with RA patients at UCL.....	206
Retreatment options with RTX in RA.....	207
Rituximab in other autoimmune diseases.....	208
Rituximab in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.....	211
B-cell activating factor (BAFF) family	212
B-cell activating factor (BAFF).....	212
BAFF levels change after BCDT	217
B cell activating factor receptor (BAFF-R or BR3)	219
Transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI).....	221
B-cell maturation antigen (BCMA)	224

STUDY JUSTIFICATION.....	225
HYPOTHESIS:	227
OBJECTIVES:	228
MATERIAL AND METHODS	229
Design.....	229
Patients	229
Exclusion criteria	232
Variables	233
Techniques	235
Assessment of B-cell depletion.....	235
Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation and staining	237
Flow cytometry	237
Sample preparation	238
Flow cytometer	246
Data analysis.....	246
Measurement of BAFF.....	246
Statistics	247
RESULTS	248
Patterns of relapse in the RA cohort treated with RTX at UCL.....	248
Expression of BBRs on B cell subsets from RA patients relapsing after BCDT	251
1. B cell phenotypes in patients relapsing after rituximab.....	254

2. Is there a correlation between B cell phenotypes and the time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse in post-RTX RA patients?.....	257
3. BAFF-binding receptor expression in RA patients pre-RTX and post-RTX at relapse.	258
5. Is there a correlation between BBR expression and the time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse in post-RTX RA patients?	269
5. BAFF levels	271
6. Do serum BAFF levels correlate with BBR expression?.....	272
Expression of BAFFR on B cell subsets from TTP patients after BCDT	274
1. B cell phenotypes at B cell repopulation following rituximab	276
2. B cell phenotypes in TTP patients after B cell return	277
3. Is there a correlation between B cell phenotypes and the time after RTX therapy was administered?	279
4. BAFF-R expression at B cell repopulation	280
5. BAFF-R expression in TTP patients after B cell repopulation.....	282
6. Is there a correlation between BAFFR expression and the time after RTX therapy was administered?	285
7. BAFF levels	286
8. Do serum BAFF levels correlate with BAFF-R expression?	287
DISCUSSION	289
Patterns of relapse in the RA cohort treated with RTX at UCL.....	289
B cell subpopulations in RA and TTP patients after RTX.....	291
BAFFR expression	294
BCMA expression.....	296
TACI expression	297

BBR studies in autoimmune diseases	298
BAFF levels	300
Correlation between BAFFR expression and BAFF levels	301
Correlation between BAFFR expression and time after repopulation/RTX infusion	303
Limitations of the study	304
CONCLUSIONS	306
BIBLIOGRAPHY	309

TABLE INDEX

Table 1: The 1987 revised ACR criteria for the diagnosis of RA	188
Table 2: The 2010 ACR/EULAR classification criteria for RA	189
Table 3: Demographics and previous and concomitant therapy from the RA cohort treated with RTX at UCL	249
Table 4: RA patients before RTX therapy: baseline characteristics.....	252
Table 5: RA patients relapsing after RTX: characteristics	253
Table 6: Demographics and laboratory data in TTP patients	275
Table 7: Demographics and laboratory data in RA patients included in the comparative study with TTP	276

FIGURE INDEX

Figure 1: B cell differentiation and activation.....	192
Figure 2: B cell development and characteristic surface marker for each B cell subpopulation.	193
Figure 3: B lymphocyte subpopulations according to the surface markers IgD/CD27.....	194
Figure 4: B cell subpopulations according to the surface markers IgD/CD38, in combination with the B cell memory marker CD27.	195
Figure 5: Equivalence between the different memory B cell subtypes.	196
Figure 6: CD20+ B cells.....	199
Figure 7: Flow cytometry study from a patient who remained depleted 6 months after the treatment.	202
Figure 8: Flow cytometry study pre and post-RTX according to the surface markers IgD/CD27 and IgD/CD38.....	203
Figure 9: BAFF and APRIL ligands and receptors.	214
Figure 10: B cell developmental stages and BBR expression.	215
Figure 11: UCL RA and RTX clinic organization.	236
Figure 12: cell selection in flow cytometry according forward (FSC-H) and side scatter (SSC-H)	238
Figure 13: Initial gating on the lymphocyte population, and later selection of the CD19+ population.	240
Figure 14: B cell classification defined on the basis of IgD/CD38 expression: naïve transitional, naïve mature, resting memory (IgD-RM), IgD+ resting memory (IgD+RM), post-germinal center (post-GC) and plasmablasts.....	241
Figure 15: B cell classification defined on the basis of IgD/CD27 expression: naïve, pre-switch memory, switched memory and IgD-CD27- resting memory B-cells.	242

Figure 16: Example of a flow cytometry study representing BAFF-R expression in CD19+ cells.	243
Figure 17: Example of a flow cytometry study representing TACI expression in CD19+ cells.	244
Figure 18: Example of a flow cytometry study representing BCMA expression in CD19+ cells.	245
Figure 19: Concordant and discordant relapse graph:	251
Figure 20: Example of a citometry plot showing B-cell phenotypes.	254
Figure 21: Percentages for B-cell phenotypes defined by IgD/CD38 expression in pre and post-RTX patients.	256
Figure 22: Absolute numbers for B-cell phenotypes defined by IgD/CD38 expression in pre and post-RTX patients.	257
Figure 23: Correlation between phenotype % and time between peripheral B cell repopulation after RTX and clinical relapse.....	258
Figure 24: BAFF-R+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	260
Figure 25: BAFF-R MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	262
Figure 26: Flow cytometry plot of BAFF-R expression in a patient pre and pos-RTX	263
Figure 27: TACI+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	264
Figure 28: TACI MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	265
Figure 29:Flow cytometry plot of TACI expression in a patient pre and pos-RTX.....	266
Figure 30: BCMA+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	267
Figure 31: BCMA MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients.....	268

Figure 32: Flow cytometry plot of BCMA expression in a patient pre and pos-RTX.	268
Figure 33: Correlation between BAFF-R+ve % expression and time between peripheral B cell repopulation and clinical relapse.....	269
Figure 34: correlation between BAFF-R MFI expression and time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse.	270
Figure 35: Serum BAFF levels in HC, pre-RTX patients, and post-RTX.	271
Figure 36: correlation between BAFF levels and BAFFR% +ve expression in RA patients.....	272
Figure 37: correlation between BAFF levels and BAFFR% +ve B cells in post-RTX patients.....	273
Figure 38: Representative plots of B cell phenotype at B cell return in a patient with TTP and one with RA, according to IgD/CD27 expression.....	276
Figure 39: Comparison of B cell phenotype (IgD/CD27) between patients with RA and TTP at B cell return.	277
Figure 40: Evolution of B cell phenotype distribution in TTP patients throughout the course of RTX treatment.	278
Figure 41: relationships between B cell subpopulations with time after rituximab (RTX).	280
Figure 42: BAFF-R expression in TTP and RA patients at repopulation	281
Figure 43: BAFF-R expression in TTP and RA patients at B cell return.....	282
Figure 44: BAFF-R +ve % B cells on B cell subpopulations in TTP patients before and after RTX.....	284
Figure 45: Relationships between BAFF-R expression (% and MFI) and time after B cell repopulation	285
Figure 46: Serum BAFF levels in HC and TTP groups before and after RTX.	286
Figure 47: Relationship between serum BAFF levels with time after RTX in patients remaining in long-term remission.	287

Figure 48: Relationships between serum BAFF levels after RTX with BAFF-R expression.....	288
--	-----

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

Ab: Antibody

ACPA: antibodies to citrullinated peptide antigens

ACR: American College of Rheumatology

Ag: Antigen

ANCA: Antineutrophil cytoplasmic antibody

BAFF / BLyS: B-cell activating factor / B-lymphocyte stimulator

BAFFR-R / BR3: B-cell activating factor receptor

BBRs: BAFF binding receptors

BCDT: B cell depletion therapy

BCMA: B cell maturation antigen

BCR: B-cell receptor;

BM: Bone marrow

C-R: concordant relapse

CD: clusters of differentiation

CD40L: CD40 ligand

CDR: complementary determinant region

CRP: C reactive protein

CSR: class switch recombination

CVID: common variable immunodeficiency

CYC: Cyclophosphamide

DAS: Disease activity score

D-C: discordant relapse

DMARDS: Disease-modifying antirheumatic drugs

ESR: erythrocyte sedimentation rate

EULAR: European League Against Rheumatism

FACS: fluorescence activated cell-sorter

FITC: fluorescein isothiocyanate

GC: germinal centre

HACAs: human anti-chimaeric Ab

HC: Healthy controls

Ig: immunoglobulin

IL: interleukin

ISC: Immunoglobulin secreting cells

MFI: mean fluorescence intensity

MM: multiple myeloma

MTX: methotrexate

MZ: marginal zone

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PE: phycoerythrin

PerCP-Cy5.5: peridinin chlorophyll protein cyanin

PEX: plasma exchange

RA: Rheumatoid arthritis

RHF: Rheumatoid factor

RTX: Rituximab

SER: Sociedad Española de Reumatología

SHM: somatic hypermutation

SLE: systemic lupus erythematosus

SS: Sjögren syndrome

TACI: transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor

TLR: Toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

TTP: thrombotic thrombocytopenic purpura;

UCL: University College London

SUMMARY

Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease with joint involvement and extra-articular features. It is the most common inflammatory arthritis, affecting 0.5-1 % of the general population worldwide. AR and other autoimmune diseases are characterized by autoantibody production. RA treatment includes conventional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), among those, Rituximab (RTX) is a chimaeric mouse–human monoclonal antibody (Ab) directed at the CD20 molecule. It is also used in the treatment of other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP).

B cell depletion therapy based on RTX was first used at University College London (UCL) in 1998; according to their first results, they described two patterns of relapse: either occurring coincident with B-cell return (concordant relapse – C-R) or ‘delayed’ occurring months after B-cell return (discordant relapse - D-R).

B-cell activating factor (BAFF) plays an essential role in B-cell maturation, homeostasis and survival. BAFF can bind to 3 receptors (BAFF binding receptors (BBRs): BAFF-receptor (BAFF-R or BR3), transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA). The 3 BBRs are differentially expressed on B-cells during development. Serum BAFF levels are raised during B cell depletion after RTX, and decrease

progressively after B cell repopulation. The previous study done in relapsing RA patients after RTX found a reduced BAFF-R expression in naïve and memory B cells, especially in C-R patients.

The current thesis focuses initially on a review of the cohort of RA patients treated with RTX at UCL, to calculate the frequency of the C-R and D-R patterns. A study of the BAFF family, and the three BBRs (BAFF-R, TACI and BCMA) is then performed in RA patients, looking at possible differences in the relapsing patterns. Finally, a comparative study between TTP and RA patients has been performed. TTP is also a disease directly associated to autoantibody production but. As opposed to RA, TTP patients usually stay in remission after a single cycle of RTX, which facilitates the study of the long-term effects of RTX in B cell subpopulations and the BAFF/BAFF-R system, years after the therapy has been administered.

Hypothesis:

The two different patterns of relapse after B cell repopulation following B cell depletion therapy (BCDT) based on Rituximab (RTX) could be explained by differences in the expression of B-cell activating factor (BAFF) binding receptors (BBRs).

Objectives:

Main objective:

- Analyze B cell subsets, BAFF levels and BBR expression in healthy controls and RA patients, divided in three groups: pre-RTX, C-R and D-R.

Secondary Objectives:

- Perform a retrospective observational study of the RA cohort treated with RTX at UCL, analyzing the pattern of relapse after one cycle.
- Perform a comparative study between RA and TTP patients, analyzing B cell subsets, BAFF levels and BAFF-R expression.

Material and methods

- Analysis of the cohort of RA patients treated with RTX at UCL between 1998-2012, collecting demographic and laboratory data, previous and concomitant treatments, CD19+ B cell count by flow cytometry, and time between the treatment and repopulation, and between repopulation and relapse.
- Analysis of B cell subpopulations, BAFF serum levels and BBR expression (BAFF-R, TACI and BCMA) in RA patients treated with RTX. A total of 37 RA patients were selected, and divided in 3 groups: RA pre-RTX patients, RA relapsing patients after RTX, divided into 2 groups according to their pattern of relapse: C-R and D-R. Flow cytometry studies were performed for B cell

subpopulation studies, according to the IgD/CD38 classification, and BBR expression was calculated for each B cell subpopulation. BAFF levels were quantified with an ELISA test.

- Analysis of B cell subpopulations, BAFF serum levels and BAFF-R expression in TTP patients, comparing the results with RA patients. Samples from 19 TTP patients were obtained, and 6 RA patients were selected for the comparative study. Flow cytometry studies were performed for B cell subpopulation studies, according to the IgD/CD27 classification, and BBR expression was calculated for each B cell subpopulation. BAFF levels were quantified with an ELISA test.

Results

271 patients have received RTX at UCL Rheumatology department between 1998 and 2012. Total patient-years follow up was 886.05 and total number of cycles administered was 910. Patients with good response after 1 cycle of RTX were selected, a total of 168 patients who had been followed up at least until their first relapse, which occurred 4 to 45 months after the first cycle. Seventy % (118 pat) of the analyzed patients showed a C-R pattern. Mean time to repopulation in those patients was 7,1 months (range 3-20 months), whereas mean time to relapse was 7,7 months (range 3-20 months). Thirty % (50 pat) of the analyzed patients showed this pattern of relapse. Mean time to repopulation was 7,8 months (range 3-20 months), whereas mean time to relapse was 17,4 months (range 6-67 months).

Phenotype and BBR study in RA patients analysed before RTX and at relapse (C-R or D-R) after B cell repopulation showed a higher % of transitional B cells in C-R patients, whereas D-R patients had a higher % of naïve mature B cells. BAFFR+ve % expression was significantly reduced in all patients after RTX treatment, with a more profound decrease in C-R patients. TACI expression analysis showed a decrease in TACI+ve % memory B cells in post-RTX patients. BCMA analysis did not show relevant results. A significant direct correlation was observed between the BAFFR+ve % expression and time from repopulation to relapse in naïve B cells (both subtypes) and post-germinal center B cells. A significant inverse correlation was found between BAFF levels and BAFFR+ve % expression in all B cell subpopulations except for plasmablasts.

In the comparative RA and TTP study in patients at repopulation after RTX, repopulation started with a high % of naïve B cells in both diseases. In TTP patients in remission 10-68 months after RTX most B cells were still naïve, with a partial recovery in memory B cell %, depending on the time after RTX. At repopulation, BAFF-R expression was decreased in RA as well as in TTP patients; BAFF-R expression had increased in TTP patients in remission, with a gradual increase related to the time after the therapy. A significant inverse correlation was found between BAFF levels and BAFFR+ve % expression in all B cell subtypes.

Conclusions

There are two clear patterns of relapse after repopulation in patients with RA treated with RTX, with 70 % of the patients showing a C-R pattern and 30 % of the

patients showing a D-R pattern in this study. Monitoring of B cell depletion and repopulation by high-sensitivity flow cytometry is useful for identifying every patient's cycle duration, and can be used in daily clinical practice.

The process of B-cell repopulation after RTX in patients with RA and TTP follows a similar pattern to ontogeny, with a higher frequency of naïve B cells and a delayed regeneration of the memory B-cell pool. RTX produces long-term effects in the B cell population, with persistent high % of naïve B cells and reduced % of memory B cells years after the treatment, as seen in TTP patients in long-term remission after one RTX cycle.

BAFFR expression is lowest at repopulation after RTX in both diseases studied, and tends to increase over time. The mechanism of relapse in C-R patients would be independent of the BAFF/BBR system, but in D-R patients BAFF-R expression increases gradually over time, so their mechanism of relapse would follow a more “normal” pathway with B cell development and maturation dependent of the BAFF/BBR system. TACI and BCMA importance are not clear, and results in this study were not conclusive. In conclusion, although differences in BBR expression have been found between RA patients with a C-R and D-R pattern, monitoring of BAFF and BBR expression does not provide additional data that helps predict the pattern of relapse in an RA patient treated with RTX, therefore it cannot be suggested for daily clinical practice.

Key words: rheumatoid arthritis, B cell, rituximab, B-cell activating factor (BAFF), B-cell activating factor-receptor (BAFF-R), thrombotic thrombocytopenic purpura.

INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease with joint involvement and extra-articular features. Clinical presentation is characterized by symmetrical pain and swelling, particularly in the small joints of the hand, and is often accompanied by stiffness and fatigue. Extra-articular features include pulmonary, cardiac, ocular or cutaneous involvement, as well as the development of rheumatoid nodules or a systemic vasculitis.

RA is the most common inflammatory arthritis, affecting 0.5-1 % of the general population worldwide. It is more common in women (3:1 proportion) [1]. It is most frequent at ages between 40-60 years, however it can develop at any age.

The American College of Rheumatology (ACR) published the initial criteria in 1987, which included: morning stiffness, arthritis of 3 or more joints, arthritis in hand joints, symmetrical arthritis, rheumatoid nodules, serum rheumatoid factor (RHF), and radiographic changes (erosions). Four out of the 7 criteria had to be present for at least 6 weeks [2].

Table 1: The 1987 revised ACR criteria for the diagnosis of RA

Criterion	Definition
1. Morning stiffness	Morning stiffness in and around the joints, lasting at least 1 hour before maximal improvement
2. Arthritis of 3 or more joint areas	At least 3 joint areas simultaneously have had soft tissue swelling or fluid (not bony overgrowth alone) observed by a physician. The 14 possible areas are right or left PIP, MCP, wrist, elbow, knee, ankle, and MTP joints
3. Arthritis of hand joints	At least 1 area swollen (as defined above) in a wrist, MCP, or PIP joint
4. Symmetric arthritis	Simultaneous involvement of the same joint areas (as defined in 2) on both sides of the body (bilateral involvement of PIPs, MCPs, or MTPs is acceptable without absolute symmetry)
5. Rheumatoid nodules	Subcutaneous nodules, over bony prominences, or extensor surfaces, or in juxtaarticular regions, observed by a physician
6. Serum rheumatoid factor	Demonstration of abnormal amounts of serum rheumatoid factor by any method for which the result has been positive in <5% of normal control subjects
7. Radiographic changes	Radiographic changes typical of rheumatoid arthritis on posteroanterior hand and wrist radiographs, which must include erosions or unequivocal bony decalcification localized in or most marked adjacent to the involved joints (osteoarthritis changes alone do not qualify)

Arnett et al, 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis

Diagnostic criteria have been recently redefined in the collaborative publication from the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR). They classify the disease as “definite RA” by the confirmation of synovitis in at least one joint, absence of an alternative diagnosis better explaining the synovitis, and achievement of a total score of 6/10 in 4 domains: number and sites of involved joints (0-5), serological abnormality (0-3) (including RHF and antibodies to citrullinated peptide antigens (ACPA), elevated acute-phase response: erythrocyte sedimentation rate (ESR) or C reactive protein (CRP) (0-1) and symptom duration [3].

Table 2: The 2010 ACR/EULAR classification criteria for RA

Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A-D; a score of $\geq 6/10$ is needed for classification of a patient as having definite RA)‡	
A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)**	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)††	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Negative RF and negative ACPA	0
Low-positive RF or low-positive ACPA	2
High-positive RF or high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)§§	
Normal CRP and normal ESR 0	0
Abnormal CRP or normal ESR 1	1
D. Duration of symptoms¶¶	
<6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Aletaha et al, 2010. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.

Uncontrolled active arthritis causes joint damage, disability and decreased quality of life. Therefore, a treat-to-target strategy is currently followed, aiming to reach a target of remission or low disease activity in every patient [4]. Management of RA rests on the use of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), which reduce synovitis, systemic inflammation and progression of joint damage. Conventional DMARDs include chemical agents such as methotrexate (MTX), sulfasalazine or leflunomide. Biological DMARDs include tumor necrosis factor inhibitors (anti-TNF), the anti-CD20 agent rituximab (RTX), the T cell co stimulation inhibitor abatacept and the interleukin (IL)-6 receptor-blocking monoclonal antibody tocilizumab [5].

Autoantibody production is characteristic of most autoimmune diseases including RA. They appear in the serum of RA patients many years before the onset of the disease, suggesting an early break in B cell tolerance [6]. Normal B cells produce antibodies (Ab) to foreign antigen, but any random Ig mutation during immune responses to any antigen (Ag) may change the conformation of the Ag binding site. If

this new Ag binding site interacts with a self Ag in such a way so as to generate positive survival signals, the B lymphocyte may survive and proliferate, as an autoreactive B cell, producing Ab against endogenous Ag, known as autoantibodies [7].

Developing B cells are subject to two checkpoints. First occurs in the bone marrow (BM), between the early immature and immature B cell stage. Autoreactive B cells either are eliminated through deletion or lose self-reactivity through a process called receptor editing; very strong BCR signals generally drive death in the BM [8]. The second checkpoint occurs in the spleen and the circulation, where transitional B cells differentiate en route to becoming mature follicular or marginal zone B cells; usually less-avid self-reactive clones become anergic and are lost at this point, fail to enter the long-lived mature naive B cell pool [9].

However, RA patients exhibit defective central and peripheral B cell tolerance checkpoints, allowing the accumulation of peripheral mature naive autoreactive B cells that can recognize classical RA autoantigens with low affinity, and therefore produce autoantibodies [10].

B cell subpopulations

In humans, all B cells originate from common precursors in the bone marrow (BM). B cells locate in the BM, peripheral blood and secondary lymphoid tissues, depending on their stage of maturation, activation and differentiation, and are distinguished on the basis of differential expression of various surface markers (clusters of differentiation (CD) and surface immunoglobulin (Ig) isotypes. Surface Ig is

associated with other molecules, mainly CD19 and CD21, setting up the B-cell antigen receptor (BCR).

B cell development involves a first antigen-independent phase in the BM, and a later antigen-dependent phase in secondary lymphoid tissues. B cell precursors (pro-B cells and pre-B cells) are found in the BM, and transitional, naïve mature, memory B cells and plasmablasts are found in peripheral blood. Plasmablasts are recently differentiated antibody-producing cells, usually short-lived, but can recirculate and home to tissues such as the mucosa or the BM, where they can differentiate into fully mature plasma cells, which are rarely seen in peripheral blood. Centroblasts and centrocytes are found in secondary lymphoid tissues, participating in germinal centre reactions, and are not present in peripheral blood [11].

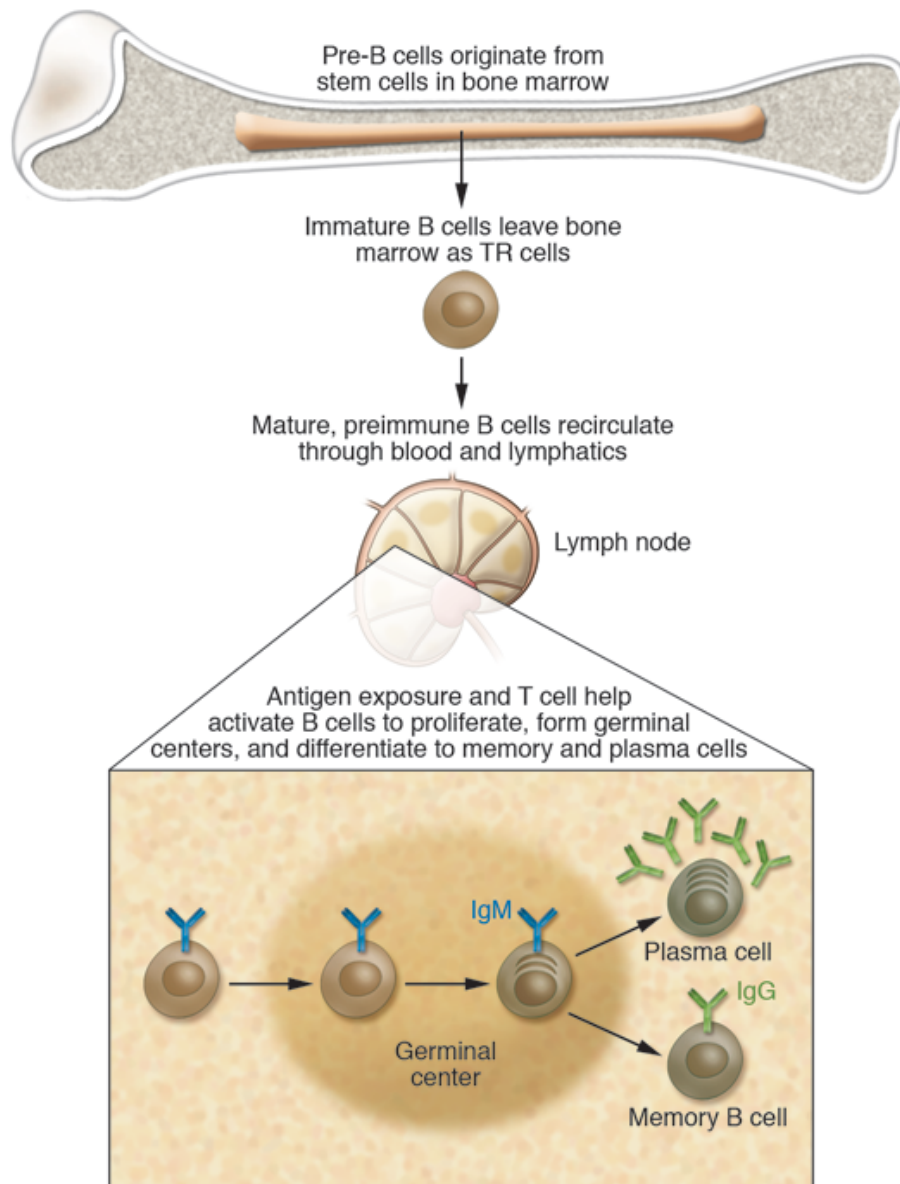


Figure 1: B cell differentiation and activation.

B cells originate and complete initial phases of differentiation and maturation in the bone marrow. Immature B cells exit the bone marrow and move to the circulation as transitional B cells, then complete maturation in lymphoid tissues. If activated by Ag and T cell help, B cells will proliferate and form germinal centers, culminating in the generation of memory and plasma cells. *Modified for RA from Cancro et al 2009. "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".*

Next figure shows B cell development and characteristic surface markers for each B cell subpopulation in more detail.

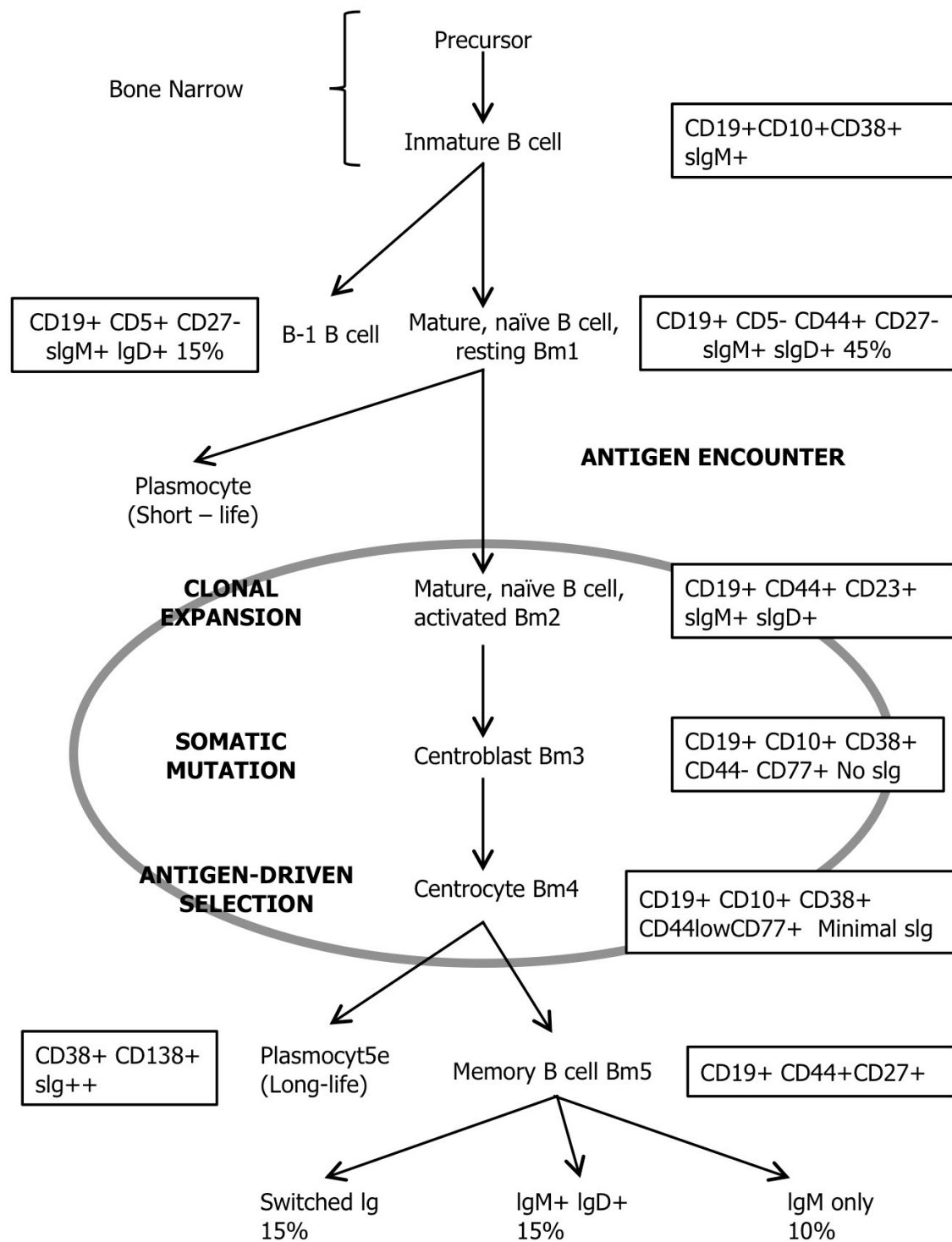


Figure 2: B cell development and characteristic surface marker for each B cell subpopulation.

Memory B cells were traditionally characterized by the CD27 marker, including IgM+IgD⁺ B cells, IgM⁻ only, and switched IgM-IgD⁻ cells [12]. However, isotype-switched CD27⁻ memory B cells expressing a mutated receptor was described later on, different from the traditional CD27⁻ naïve B cell subset [13]. Next figure shows an example of a flow cytometry study using IgD/CD27 markers.

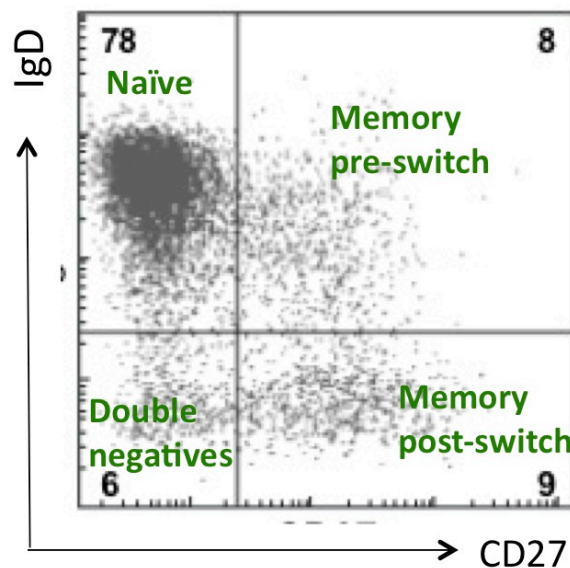


Figure 3: B lymphocyte subpopulations according to the surface markers IgD/CD27.

B cell subpopulations described are: naïve B cells (IgD⁺CD27⁻), pre-switch memory (IgD⁺CD27⁺), post-switched memory (IgD⁻CD27⁺) and double negative memory B cells (IgD⁻CD27⁻). *Modified from Berkowska et al, "Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways".*

Berkowska et al describe three different GC-dependent and –independent memory B-cell maturation pathways: CD27-IgG⁺ and CD27-IgM⁺ B cells are derived from primary GC reactions, and CD27-IgA⁺ and CD27-IgG⁺ B cells are from consecutive GC responses (pathway 1); natural effector and CD27-IgA⁺ memory B cells have limited proliferation, reflecting a GC-independent origin; natural effector cells originate in part in the splenic marginal zone (pathway 2); CD27-IgA⁺ cells share

characteristics with gut lamina propria IgA⁺ B cells, suggesting their common origin from local GC-independent responses (pathway 3) [14].

Bohnhorst et al described peripheral B cell subpopulations according to the IgD/CD38 classification, in combination with the memory B cell marker CD27 [15]. This way, they were able to clarify which cells from the IgD/CD38 classification were memory B cells. Appart from the post-germinal centre (post-GC: IgD-CD38⁺) memory B cells, they defined two subtypes of CD38⁻ memory B cells: IgD⁺ (IgD⁺ resting memory) or IgD⁻ (IgD⁻ resting memory).

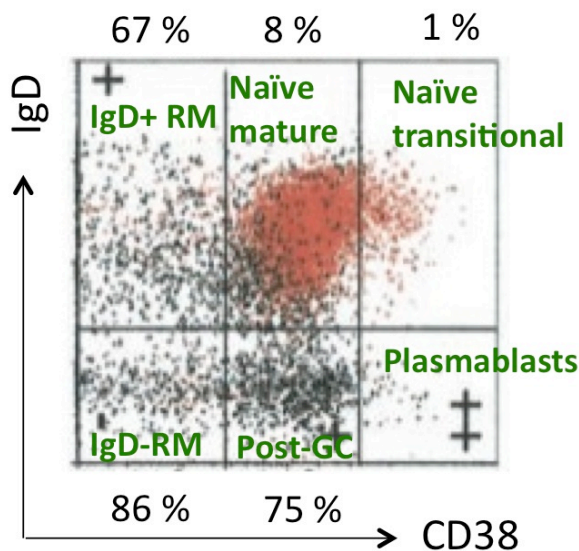


Figure 4: B cell subpopulations according to the surface markers IgD/CD38, in combination with the B cell memory marker CD27.

Black cells are CD27⁺; % indicates which % of the cell subtype is CD27⁺. B cell subpopulations described are: naïve transitional (IgD⁺CD38⁺⁺), naïve mature (IgD⁺CD38⁺), IgD⁻ resting memory (IgD⁻CD38⁻), IgD⁺ resting memory (IgD⁺CD38⁻), memory post-GC (IgD⁻CD38⁺) and plasmablasts (IgD⁻CD38^{++/+++}). Modified from Bohnhorst et al. "Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome".

Therefore, combination of the markers IgD/CD27/CD38 facilitates the equivalence of the different memory B cell subsets described. IgD⁺ resting memory B

cells would be equivalent to pre-switch memory B cells, and IgD-resting memory and post-GC B cells would be equivalent to memory post-switch B cells.

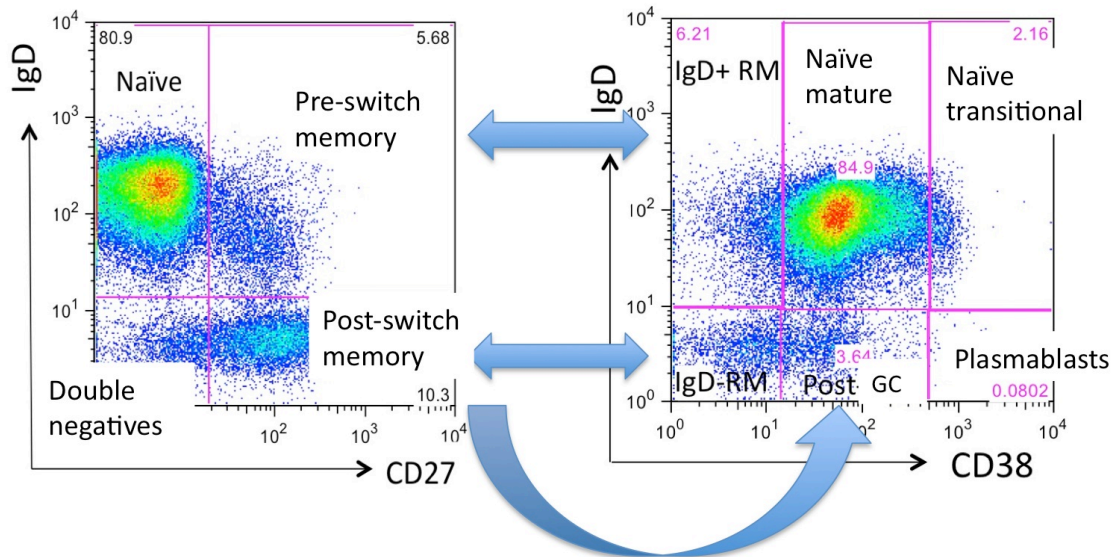


Figure 5: Equivalence between the different memory B cell subtypes.

IgD⁺ resting memory B cells would be equivalent to pre-switch memory B cells, and IgD-resting memory and post-GC B cells would be equivalent to memory post-switch B cells.

Immunologic memory lies in long-lived B and T cells derived from the initial immune response. After Ag recognition, mature B cells proliferate and can further optimize antigen-binding by somatic hypermutation (SHM), introducing point mutations in the V(D)J exons of their Ig heavy and light chains, and selecting high-affinity mutants [16]. Moreover, the Ab effector functions can be modified by Ig class-switch recombination (CSR), changing the isotype of the *IGH* constant region from ν to α , δ , ϵ or γ [17].

Germinal centres (GC) are specialized structures in secondary lymphoid organs involved in the affinity maturation of T-dependent responses through proliferation,

SHM, CSR and selection of Ag-responsive B cells. The splenic marginal zone (MZ) is a ring structure around B cell follicles in the spleen, composed mainly of MZ B lymphocytes which respond to T-independent Ag. MZ B cells are characterized by a sIgM^{high}sIgD^{low}CD27⁺ phenotype [18].

Ag recognition takes place through the BCR, but B cells need a second signal to become activated. In T-cell dependent B cell responses, activated T cells provide a signal via CD40 ligand (CD40L) which interacts with CD40 on B cells. They are characterized by GC formation, extensive B-cell proliferation, affinity maturation, and Ig CSR, forming high-affinity memory B cells and Ig-secreting plasma cells [19]. B-cells also respond to T-cell independent Ag, in the splenic MZ and mucosal tissues [20].

B cells drive the inflammatory processes involved in RA by different mechanisms. They are the precursors of short-lived plasma cells that produce autoantibodies, which are capable of forming small immune complexes. Those interact with the Ig receptor Fcγ receptor type IIIa (FcγRIIIa) on macrophages in joints and in other tissues [7], which may be responsible for the production of proinflammatory cytokines [21, 22]. B cells are also antigen-presenting cells and activators of T cells [23].

B cell depletion therapy based on Rituximab®

Rituximab® (RTX) is a chimaeric mouse–human monoclonal Ab directed at the CD20 molecule expressed on the surface of human B cells. It was developed for the treatment of B-cell-non-Hodgkin's lymphoma, first approved in 1997 [24, 25]. It was

licensed for treatment for refractory RA in 2006, and for treatment of serious active granulomatous polyangeitis (Wegener's granulomatosis) and microscopic polyangeitis in 2014. It is widely used in other autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) or Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP).

CD20 is a nonglycosylated phosphoprotein expressed at high levels on the surface of almost all B cells. It is resident in lipid raft domains of the plasma membrane, where it probably functions as a "store-operated calcium channel" following ligation of the BCR for antigen [26]. CD20 allows dense accumulation of monoclonal antibodies on the cell surface, not being internalized or shed from the plasma membrane, therefore monoclonal antibodies persist on the cell surface for extended periods of time and permit a sustained immunologic attack from complement (complement-dependent cytotoxicity) and Fc receptor expressing innate effectors (Ab-dependent cellular cytotoxicity) [27].

RTX will lead to a major depletion of peripheral B cells in peripheral blood and other tissues [28], but the CD20 molecule is not expressed by BM stem cells, early B cell precursors (pro-B cells) [29] or fully differentiated plasma cells, which would not be directly depleted by RTX [29, 30]. Therefore, long-lived plasma cells are expected to survive and lead to sustained immunoglobulin production, whereas short-lived populations will not be replaced following depletion of their precursors.

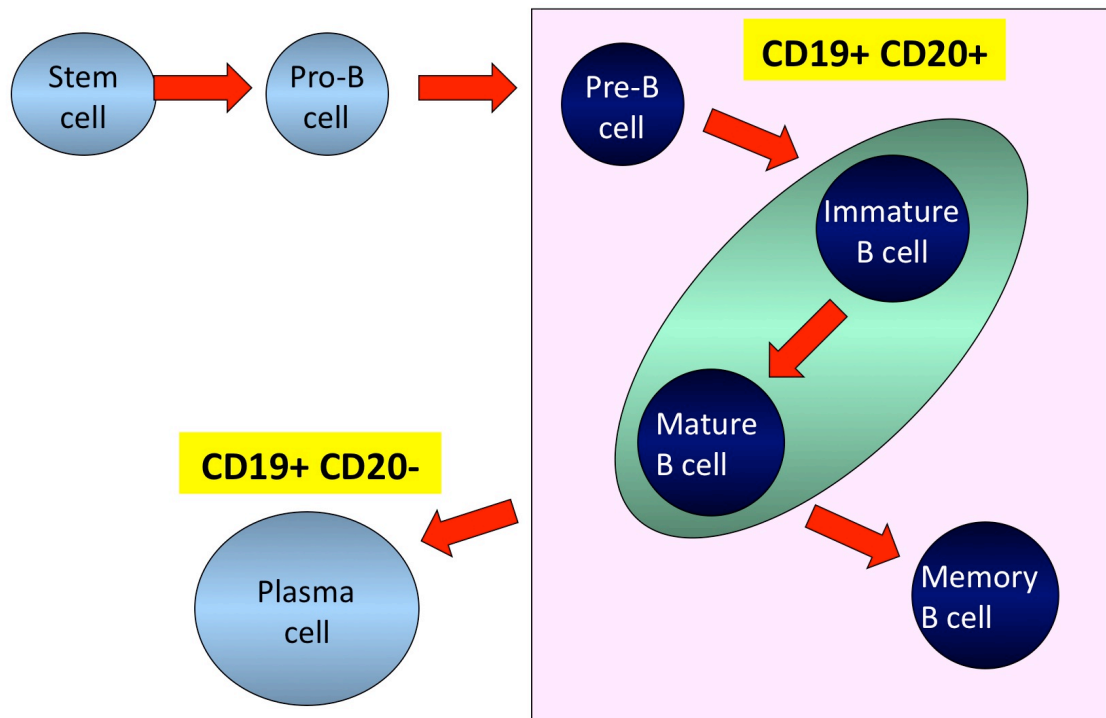


Figure 6: CD20+ B cells.

RTX depletes CD20 + B cells as shown in the figure, not affecting stem cells, pro-B cells or plasma cells.

The beneficial effects of B-cell depletion might act through their influence on pathogenic autoreactive plasma cells, affecting autoreactive more than protective humoral immunity, since levels of protective Ig are usually kept [31].

Once RTX is present in plasma, it interferes with the flow cytometry in the assessment of CD20. Therefore, a separate B cell marker is required in order to assess B lymphocyte level. CD19 is a surface marker also present on B cells, so it is used for B cell analysis after the exposure of plasma to RTX [32].

Repopulation of peripheral blood B cells usually starts 6-9 months after the therapy, and occurs predominantly with naïve B cells, suggesting a recapitulation of normal B cell ontogeny similar to what is seen after bone-marrow transplantation [33-

35]. It has been investigated in different diseases treated with BCDT based on RTX, including lymphoma, SLE and RA, showing similar results, therefore it seems to follow the normal ontogeny B cell process [36-39].

Formation of human anti-chimaeric Ab (HACAs) after RTX has been described, but no association has been found between HACAs and clinical response or depletion in RA patients [40]. Variability in RTX levels has been found when comparing RA and SLE patients 1 and 3 months after BCDT, with faster RTX clearance in SLE patients, which may explain the inadequate depletion seen more frequently in SLE patients after BCDT [41].

B cells, Rituximab and Rheumatoid Arthritis

Hypothesizing about the role of B cells in the pathogenesis of RA [42], B cell depletion therapy based on RTX was first successfully used for Rheumatoid Arthritis (RA) at University College London (UCL), in an open study of 5 patients starting in 1998 [43]. Such study led to a randomized, placebo-controlled trial confirming its efficacy and safety in RA patients [32].

RTX was licensed for treatment of refractory RA in 2006. In Europe it is currently licensed for RA patients who have failed at least one anti-TNF agent. There is enough evidence to use it as a first biologic therapy in patients who cannot receive anti-TNF drugs. Data on long-term efficacy and safety from the open-label extension phases of registered trials [44-48] are available in the literature. A recent European League

Against Rheumatism (EULAR) consensus summarizes the recommendations for RTX use in RA [49].

RA is a heterogeneous condition probably driven by different immune mechanisms in different patient subgroups [50]. Patients with positive RHF, ACPA and elevated serum IgG concentration respond better to RTX therapy, since they are markers of a B-cell driven disease. RhF and ACPA levels in seropositive patients are not associated with a particular clinical response [51].

B cell studies in RA

First RA peripheral blood B cell studies after BCDT [36, 37] revealed a profound depletion of all peripheral B cell subpopulations after RTX. Most residual B cells showed a memory or a CD20 negative plasma cell precursor phenotype. No patient experienced a relapse of RA before repopulation.

Next graph shows an example of a flow cytometry analysis in a patient who had received RTX. Peripheral CD19⁺ lymphocytes were still depleted 6 months after the therapy. Identified B cells are memory B cells and plasmablasts.

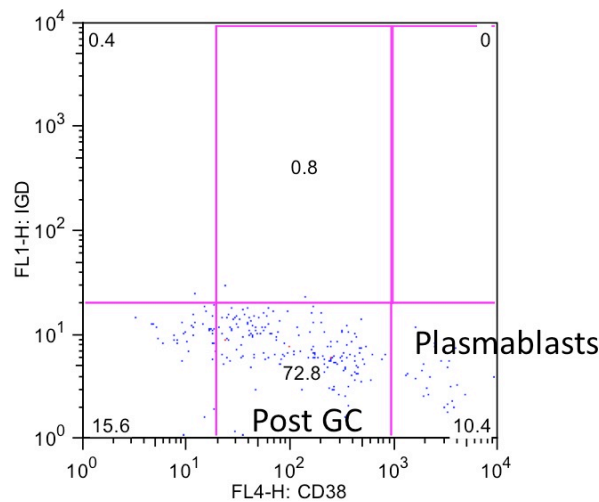


Figure 7: Flow cytometry study from a patient who remained depleted 6 months after the treatment.

Identified B cells are memory B cells and plasmablasts; there are no naïve B cells.

Repopulation occurs mainly with naïve B cells, with reappearance of transitional naïve B cells on the first place, which rapidly turn into naïve mature B cells [36, 37]. However, the memory B cell pool will remain low for more than 2 years after a single RTX course, experimenting a very slow recovery [37]. After a second cycle, B cell reconstitution follows a similar pattern [52]. Repopulation with larger numbers of memory B cells [36, 52, 53] and plasmablasts are associated with earlier relapse [36, 53].

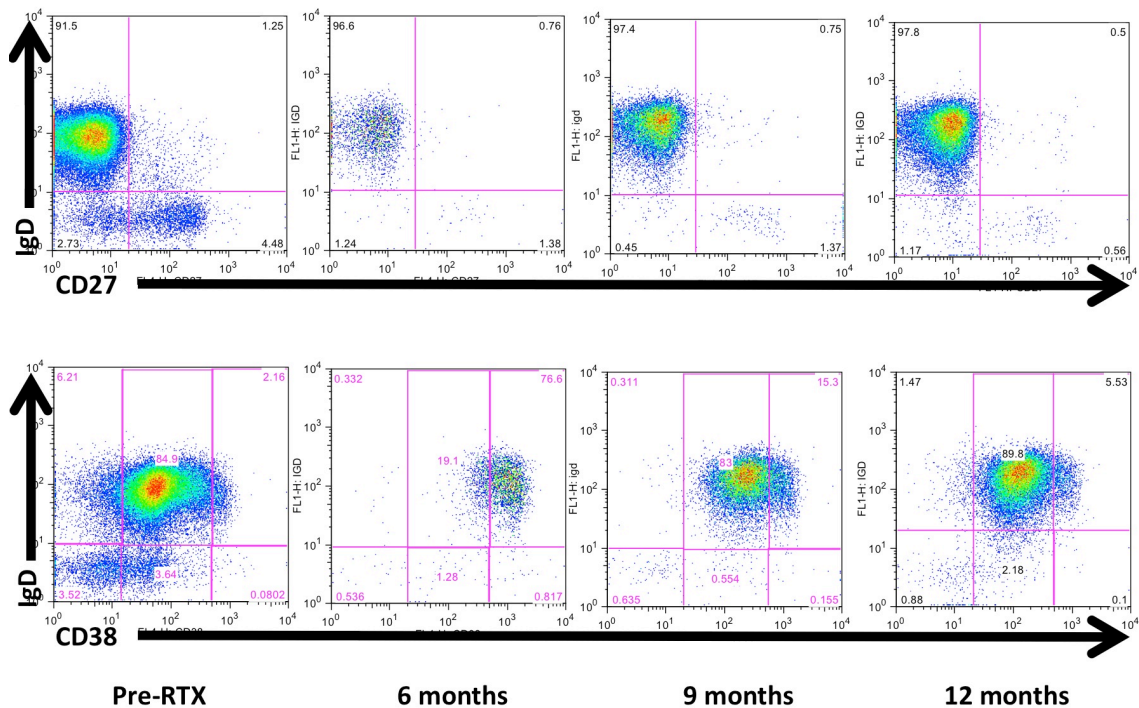


Figure 8: Flow cytometry study pre and post-RTX according to the surface markers IgD/CD27 and IgD/CD38.

Patient was studied previous to RTX therapy, 6-months after treatment at peripheral B cell repopulation, and then 9 and 12 months after treatment. B cells at repopulation were mostly naïve transitional, but at 9 and 12 months most have turned into naïve mature B cells; memory B cell % remains low.

Dass et al studied B cell depletion by high-sensitivity flow cytometry, finding persistent circulating preplasma B cells in some RA patients after BCDT, which was associated with poorer responses [54]. The same authors showed that an additional cycle of RTX could improve B cell depletion and clinical response in patients not responding to the initial cycle [55]. Incomplete B cell depletion in peripheral blood, as defined by B cell counts $>5 \times 10^6$ cells/L, is uncommon in RA patients undergoing BCDT, but it is more frequent in SLE and other autoimmune diseases [56].

It is unclear why some memory B cells are not depleted by RTX. A higher percentage of memory B-cells pretreatment has been associated with a worse response

to RTX [52, 57]. B cell depletion in solid tissues is significant but not complete, and very variable from individual to individual. Depletion is more pronounced in the spleen than in the lymph nodes, however data is limited because such studies are done in animals [28, 58]. Residual memory B cells can therefore survive in secondary lymphoid tissues and other solid organs. BM studies done after BCDT found B-cell precursors predominantly, and also CD20- plasma cells and circulating memory B cells [30, 59, 60].

In vitro studies have shown that human normal peripheral blood B cells incubated with RTX inhibit the proliferation of naïve B cells but not of CD27+ memory B cells [61]. This may suggest that B cells exposed to RTX but not depleted may have an altered function. These residual cells however are not able to expand and repopulate, but can be recruited in a secondary immune response [36].

Plasma cells are not directly depleted by anti-CD20 antibodies, which explains why Ig levels remain within the normal range after treatment with one course of RTX. Serum levels of autoantibodies, namely IgA-RF, IgG-RF, IgM-RF and ACPA, decrease after BCDT, in a higher proportion than total Ig levels or antimicrobial antibodies [62], suggesting that autoantibodies would be produced by more short-lived plasma cells, which depend on the formation of new B cells. BCDT would therefore selectively decrease short-lived plasma cells [31, 63, 64]. IgM levels, also produced by short-lived plasma cells, have been reported to decrease even after the first RTX cycle, with incremental decreases after repeat cycles [63, 65-67]. However, IgG is produced by RTX-resistant long-lived plasma cells, therefore levels of IgG are more robust and show smaller incremental drops over time, tending to increase at repopulation [66].

Synovial studies have shown that RTX can decrease B cells at the synovium, but the depletion rate is slower than in peripheral blood, suggesting B-cell persistence mechanisms at these sites, which may be the reason why improvement in RA symptoms after RTX is delayed in spite of a rapid peripheral B cell depletion [64, 68]. Persisting plasma B cells have been found in the synovium in a subset of patients, which is related to a poorer response to treatment [69]. Class-switched memory B cells were also found in synovium in flaring joints [64].

The time of repopulation in peripheral blood after BCDT probably depends on the extent of earlier depletion, drug clearance and the capacity of the BM to regenerate B cells [11]. Relapses after one cycle of RTX may sometimes occur because of incomplete depletion of secondary lymphoid tissues, where autoreactive memory B cells or long-lived plasma cells may survive, or because autoreactive memory T cells are still present and influence B-cell mediated autoimmunity [52, 70]. Additionally, other patients will need generation of new B cell clones that are precursors of autoantibody-producing plasma cells [62].

B cell repopulation does not necessarily mean that RA will relapse. Relapse after repopulation in RA is closely linked to differentiation towards immunoglobulin secreting cells (ISC) as shown by rises in autoantibodies [62], maturation into CD27+ memory phenotype [71, 72] and the presence of circulating plasma cells [37, 64, 72]. That suggests that factors promoting autoreactive B-cell maturation into ISC either from newly generated immature B-cells or from RTX-resistant memory cells or CD20-plasmablasts may be key to understanding mechanisms underlying clinical relapse [50].

Experience with RA patients at UCL

First RTX open study for RA was undertaken at UCL in 1998. Five RA patients, satisfying American College of Rheumatology (ACR) criteria for RA, were treated with BCDT based on RTX [43]. Patients were all RF+ and received RTX, Cyclophosphamide (CYC) and oral steroids. At 26 weeks all patients satisfied ACR50 response criteria. Three patients satisfied ACR70 response criteria. Two patients relapsed at 28 and 38 weeks, coincident with B cell return, but in 2 patients B lymphocytes returned with no relapse. The fifth patient reported feeling well but declined further visits.

The second study done at UCL included 22 patients who received 5 different combinations of RTX, combined or not with CYC and or oral steroids [73]. Patients who received higher doses of RTX in combination with CYC had better responses. That study led to a phase II randomized, double-blind clinical trial [32] where patients were randomized to receive one of four treatments: methotrexate (MTX) (control group); RTX (1000 mg on days 1 and 15); RTX + CYC; RTX + MTX. All RTX groups showed at least an ACR20 response compared to the MTX group, concluding that the treatment provided significant improvement in active RA patients despite MTX.

In the first 24 patients studied at UCL, approximately half of the cases relapsed at the time of return of the circulating B cells, and in the other half relapse was delayed for up to a further 2.5 years after B-cell return to the periphery [36, 70, 74]. According to those observations, two patterns of relapse were defined: either occurring coincident with B-cell return (concordant relapse – C-R) or ‘delayed’ occurring months after B-cell

return (discordant relapse - D-R). Moreover, patients tend to present the same pattern of relapse after the following cycles [70], which is determinant to treat preemptively over the following cycles and prevent further relapses [75].

Retreatment options with RTX in RA

Retreatment options for RTX in RA include treatment on flare or regular retreatment every 6 months, as supported by the 2011 updated consensus on the use of RTX in RA. Regular re-treatment may risk overtreatment in some patients [49]. However, if the disease is still active at 24 weeks, patients can improve their responses following a second course of treatment at that point [47, 48, 76]. Experience at UCL shows that patients tend to respond to each cycle of RTX for a similar length of time as previous cycles [70, 75], which is also suggested in patients followed up in trials [77].

A study done between UCL and Gregorio Marañón Hospital (Madrid) compared the incidence of hypogammaglobulinaemia in patients with RA with a fixed 6-month RTX retreatment schedule and patients treated on demand according to UCL schedule. They described a greater decrease in median IgM and IgG levels after the fourth cycle of RTX in patients with a fixed 6-month schedule. They concluded that such regime can be excessive in a proportion of patients, therefore they suggested an individualized treatment schedule for every patient after having achieved remission [78].

RTX retreatment schedule cannot be therefore predefined, and should be based on individual decisions depending on the patient's disease activity and previous length of response. At UCL, initially patients would eventually relapse and were retreated

according to their clinical needs. Over the last years, the retreatment regime has been optimized, and currently retreatment at 6 months after the first course of RTX is considered in patients who have responded but still have active disease. In patients with well-controlled disease, retreatment is administered at first signs of return of symptoms. Preemptive retreatment to achieve sustained disease control and prevent disease flare is scheduled based on the patients' length of response to the previous course of treatment, usually scheduled for about 1 month before the expected time of relapse [75].

Rituximab in other autoimmune diseases

RTX has been licensed for treatment of serious active granulomatous polyangeitis (Wegener's granulomatosis) and microscopic polyangeitis. It is also widely used in other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), inflammatory myopathies or thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) with multiple reports and studies supporting its efficacy, but clinical trials have not been able to support that, therefore it is not currently licensed for these diseases.

Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated vasculitis are multisystem autoimmune syndromes characterized by vasculitis predominantly affecting microscopic vessels, with renal involvement in 70 % of patients. Standard treatment includes high-dose steroids and cyclophosphamide (CYC), which are effective in 70-90 % of patients but have are associated with serious adverse events and high rates of death [79]. Different studies report sustained remissions in ANCA-associated vasculitis patients treated with RTX [80-82]. That led to the development of

two randomized controlled trials which were published in 2010. The RAVE (RTX in ANCA-associated vasculitis) trial concluded that RTX was not inferior to CYC for induction of remission, and could be superior in relapsing disease [83]. The RITUXVAS trial (RTX vs CYC in ANCA-associated vasculitis) included patients with renal vasculitis, finding high remission rates with both regimes, with no differences in severe adverse events [84].

RTX has been widely used in SLE, and is currently accepted as a treatment option in refractory patients [85]. SLE is an autoimmune rheumatic disorder with heterogenous clinical manifestations, characterized by the generation of pathogenic autoantibodies; B cells play a central role in the pathogenesis of the disease [86], therefore B cell depleting agents and B cell activating factor (BAFF) inhibitors have acquired a central role in its treatment [87].

At UCL, RTX was first used for SLE in the year 2000, and first study was published in 2002, reporting the experience of 6 active SLE female patients treated with two 500 mg infusions of RTX and two 750 mg CYC infusions. One patient was lost to follow up, but the 5 remaining patients showed an improvement at 6 months and, as observed in RA, clinical improvement was not limited to the period of B lymphocyte depletion, supporting the idea of B lymphocyte autoreactive clones with the ability to engage a vicious cycle of autoantibody production, taking variable amounts of time after repopulation [88].

Further studies at UCL increased the number of SLE patients treated with RTX up to 76 patients, with 24 patients having repeated treatments. RTX dosing regime was

changed after the first study: two 1000 mg infusions of RTX in combination with CYC were administered; all patients showed full B cell depletion except for one; time to repopulation ranged from 2-10 months; patients flared at variable time points after repopulation. Clinical and serological improvement was confirmed, supporting the efficacy and safety of RTX as a therapy for SLE [89-93]. Unlike RA patients, complete depletion of B cells in SLE is very variable [94] and therefore the combination of RTX + CYC is still currently used to achieve adequate B cell depletion.

The first dose-escalation trial of RTX in SLE was published in 2004. Clinical efficacy was confirmed, although no significant serological changes were found, and B cell depletion achieved was very variable. Of note, CYC was not used in combination with RTX, which probably explains the differences observed among the studies [56].

Multiple case reports and studies about RTX efficacy and safety in SLE have been published since then, generally supporting the use of RTX in SLE [95-99]. Promising results in lupus nephritis are also found in the literature [100, 101]. However, two randomized, double-blind, controlled trials have failed to meet its end points of achieving a major or partial clinical response over 52 weeks [102, 103].

SS is an autoimmune disorder characterized by ocular and oral dryness and systemic manifestations. B cells play a central role in the development, maintenance and progression of the disease [104], therefore BCDT is a reasonable therapeutic approach for the disease. Studies available in the literature show certain efficacy in the symptoms of patients treated with RTX [105-107], confirmed in randomized, placebo-control trials which are still ongoing [108, 109].

Inflammatory myopathies are characterized by symmetrical and proximal muscle weakness, increased serum muscle enzymes, electromyographic abnormalities and inflammatory cell infiltrates on muscle biopsy [110]. Multiple case reports in the literature show improvement of the disease with RTX [111-113]. However, not all patients respond, and those with confirmed myositis specific autoantibodies are more likely to respond to BCDT [114]. The largest trial published so far is the “Rituximab in myositis” double-blind, randomized trial, where 83 % of the 200 randomized patients showed improvement. Further randomized clinical trials are in development [115].

Rituximab in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

TTP is an acquired, life-threatening disease characterized by thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia and signs of organ dysfunction, including neurologic, cardiac, renal and abdominal symptoms [116]. It is due to deficiency or dysfunction of the metalloproteinase ADAMTS13 [117], which cleaves von Willebrand factor, with resulting increased platelet adhesion and thrombus formation in small blood vessels [118]. Most cases are associated with the production of autoantibodies (IgM/IgG/IgA) to ADAMTS13, of which the most predominant sub-classes are IgG4, followed by IgG1 [119].

Plasma exchange (PEX) and corticosteroids are the standard therapies but many patients require additional immunosuppression [120, 121]. First report showing efficacy of RTX in TTP was published in 2001 [122]. Different studies have confirmed RTX's efficacy in the treatment of acute TTP, significantly improving clinical outcome in these patients, who achieve higher response rates and greatly increased median times to

relapse compared with PEX alone [116, 123-126]. RTX monotherapy is also extremely effective as a pre-emptive treatment to prevent subsequent flare [126]. Remission after PEX/RTX can last for long periods of time after B-cell return in TTP patients and is related to the continuation of a reduction in the production of IgG anti-ADAMTS13 antibodies [127]. It was decided to do a comparative study between RA and TTP patients who had received RT because both are caused by autoantibodies. However RA usually needs chronic therapy with RTX, whereas TTP can remain in remission after one cycle of RTX, allowing the study of long-term effects of RTX in B cell subpopulations.

B-cell activating factor (BAFF) family

B-cell activating factor (BAFF)

B-cell activating factor (BAFF) or B-lymphocyte stimulator (BLyS), first described in 1999, is a 285-amino acid member of the tumor necrosis factor (TNF) ligand superfamily [128, 129]. It is a type II transmembrane protein, that is cleaved into soluble forms by protein convertases; its active form is composed of homotrimers [130]. It is secreted by monocytes, macrophages, activated neutrophils and dendritic cells, and plays an essential role in B-cell maturation, homeostasis and survival [131, 132].

BAFF can bind to three receptors (BAFF binding receptors (BBRs): BAFF-receptor (BAFF-R or BR3), transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA). BAFF is the sole ligand for BAFF-R, whereas TACI and BCMA each can bind BAFF or another

TNF family ligand known as APRIL (A Proliferation Inducing Ligand). These ligand-receptor interactions vary in affinity: BAFF binds more strongly to BAFF-R than to BCMA, whereas APRIL has greater affinity for BCMA, and little or no binding capacity for BAFF-R [133]. BAFF has a higher affinity for TACI compared to BCMA, and the opposite happens for APRIL [134].

The three BBRs share several features: all are Type III transmembrane proteins, lacking the signal-peptide as found in the Type I transmembrane family, which most TNF-receptor superfamily members belong to; they all contain cysteine-rich extracellular domains characteristic of members of the TNF-receptor superfamily; their expression is restricted to lymphocytes [135].

Kaur et al described a maturational delay in BBR expression in pre-term neonatal B cells, which expressed less TACI, BCMA and BAFF-R compared with adult B cells. That fact would explain the diminished Ab responses to T-independent antigens, such as bacterial polysaccharides, and the increased rate of infections with encapsulated bacteria [136]. BAFF levels have also been reported to be higher in cord blood than in the blood from corresponding mothers, which is probably a physiological response in newborns to ensure B cell survival, since the immune system and B cell repertoire are not fully developed yet [137].

The three BBRs are differentially expressed on B-cells during development and also respond in context-dependent ways to BAFF/APRIL ligation [138]. Binding of BAFF to BAFFR triggers intracellular signaling pathways that antagonize apoptosis in B cells, promoting survival. BAFF signals via BAFF-R act through activation of the

non-classical NF- κ B2 pathway, which facilitates upregulation of several antiapoptotic Bcl-2 family members [139-141]. Alternatively, both TACI and BCMA signal through the classical NF- κ B1 pathway, promoting inflammatory responses and innate immunity [140, 142].

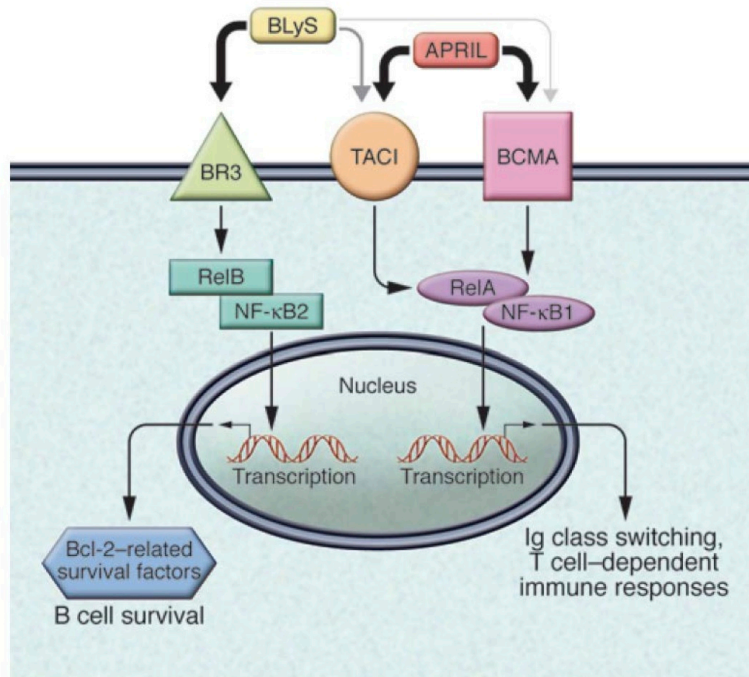


Figure 9: BAFF and APRIL ligands and receptors.

BAFF is the only ligand for BAFF-R, and both BAFF and APRIL can bind to TACI and BCMA. Intracellular signaling from the ligand binding leads to B cell survival and influences B cell differentiation. *Modified for RA from Cancro et al 2009. "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".*

BAFF B cell dependence starts at the transitional developmental stages, where immature B cells, which are the first cells to express BAFF-R and TACI, exit the BM and move to the circulation [143]. Early immature B cells express surface BAFF-R but little TACI, while later mature B cells maintain BAFF-R and upregulate TACI; these cells will turn into follicular and marginal center B cells which express the highest level of surface BAFF-R and TACI [144].

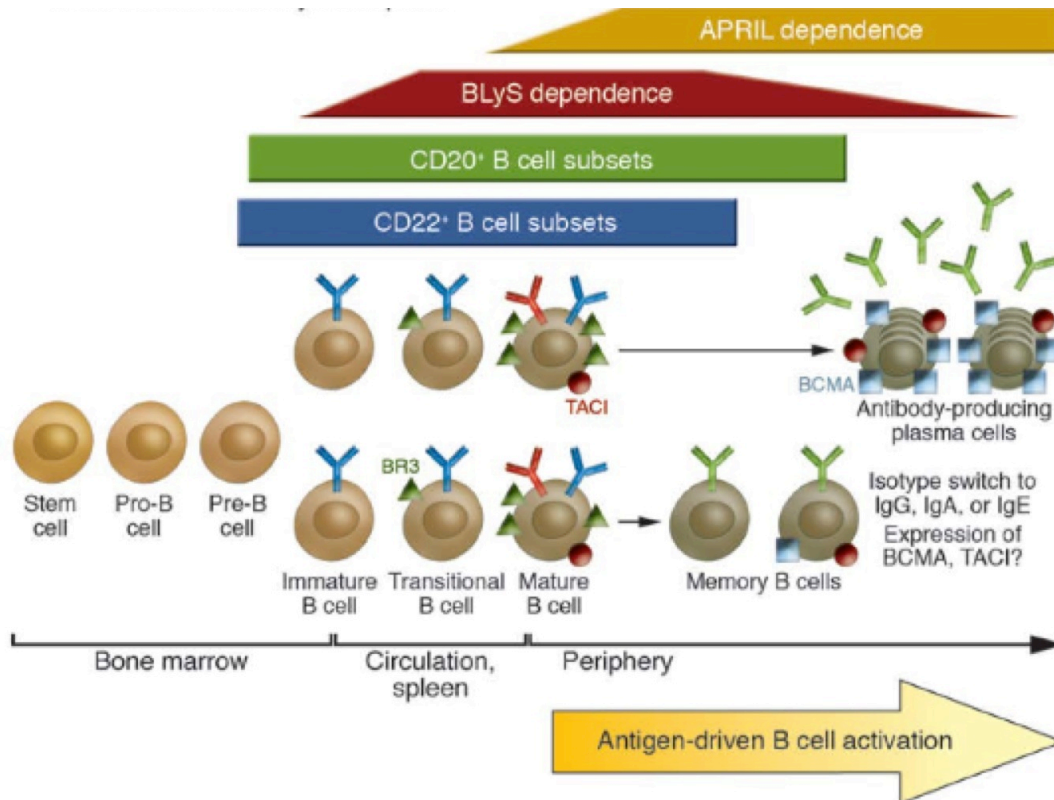


Figure 10: B cell developmental stages and BBR expression.

BAFF dependence starts at the transitional stage, at which BR3 and TACI are first expressed. After Ag-driven B cell activation, BAFF-R expression decreases, with an increase in BCMA expression. *Modified for RA from Cancro et al 2009. "The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus".*

BAFF would have two roles in the establishment and maintenance of primary B cells. First, it is the key regulator of primary B cell homeostasis by controlling B cell steps of differentiation. Second, it maintains B cell tolerance by balancing anergic cell elimination at the second checkpoint in the periphery [143].

BAFF can be however implicated in autoimmunity through T-cell independent activation of low-affinity self-reactive B cells [132]. Excess BAFF may affect the second B cell checkpoint occurring in the periphery, by rescuing autorreactive clones that usually die at the transitional stage, and allowing them to mature. Anergic cells compete poorly for available BAFF, and would only survive when BAFF levels are elevated. B

cells that undergo deletion at the immature BM stage do not express BAFFR yet, and would not be rescued by excess BAFF [145].

In this way, BAFF regulates an elastic threshold for BCR-mediated selection during transitional B cell development. B cells with relatively high BCR signal strengths should be eliminated through negative selection at the second checkpoint. However, elevated BAFF levels broaden the range of acceptable BCR signal strength, allowing more transitional B cells to survive. Reduced BAFF levels would however increase the stringency of the selection, allowing fewer cells through than normal [146, 147].

BAFF levels are increased in different autoimmune diseases such as SS or SLE [148], as well as some TTP patients at presentation [149], but they are similar to healthy controls in RA patients who have not undergone BCDT [57, 70, 71]. However, chronically raised BAFF levels have been suggested to cause a negative feedback on BAFF-receptor expression [148].

Recent publications suggest two roles for BAFF in germinal centers (GC). Systemic BAFF maintains sufficient naïve B cells for GC replenishment, antigen presentation, and organogenesis. However, the GC microenvironment lacks substantial BAFF, since surface-bound BAFF is lost upon B cell activation [150], and is then dependent on T cell production. Locally produced BAFF by T follicular helper (T_{FH}) cells is not essential for normal GC cellularity and somatic hypermutation, but it is necessary to promote the survival of B cells that produce higher affinity antibodies. The

authors suggest that BAFF overproduction, inappropriate BAFFR upregulation or TACI downregulation can prevent GC selection and lead to autoimmunity [151, 152].

BAFF enhances the differentiation of memory B cells into ISC in a T-dependent manner. However, BAFF can also play an inhibitory role in B cell differentiation, providing regulatory signals during T-cell independent events outside the GCs, protecting the balance between memory B cells and ISC [150].

Kreuzaler et al found that soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and BBR expression. They investigated patients with primary Ab deficiencies, such as common variable immunodeficiency (CVID), BAFF-R or TACI deficiency, and they were found to have higher BAFF levels than patients during anti-CD20 mediated B cell depletion, chronic lymphocytic leukemia, or HC. BAFF-BBR correlation in patients undergoing repopulation after BCDT was not studied. They concluded that the concentration of soluble BAFF depended on B cell numbers and the expression of BBRs [137].

BAFF levels change after BCDT

Cambridge et al investigated changes in BAFF levels in RA and SLE patients after BCDT. In RA patients, serum BAFF levels were found to increase markedly after BCDT, observing a strong inverse relationship between serum BAFF levels and peripheral B cell depletion in the first 4 months after the therapy. The decline in serum BAFF levels was associated with the reemergence of B cells in peripheral blood. However, patients with a concordant pattern of relapse (early relapsers: clinical relapse

happened no later than 2 months after repopulation) were found to decrease their serum BAFF levels rapidly after peripheral B cell repopulation, whereas patients with a discordant pattern of relapse (late relapsers: there was a 5-month interval between the time of repopulation and time to relapse) had significantly higher BAFF levels at repopulation and a more gradual and slow BAFF decrease after repopulation; at the point in time where those patients finally relapsed, there was no difference in serum BAFF levels between both groups [70].

This study pointed out some differences between early (concordant) and late (discordant) relapsers. In later-relapsers, B cell repopulation may occur with relatively little B cell expansion in secondary lymphoid tissues; therefore, the total B cell load at the time of repopulation would be low and BAFF levels would remain relatively high. The % of pathogenic B cells in these patients may be insufficient to trigger relapse at the point of repopulation, therefore thanks to elevated BAFF levels, pathogenic B cells would probably reexpand for variable lengths of time until having a sufficient load to trigger relapse. However, in early-relapsing patients peripheral repopulation is probably coincident with a pathogenic memory B cell expansion in secondary lymphoid tissues; therefore, the total load of pathogenic B cells would be at the threshold for promoting clinical relapse, and serum BAFF levels would not be as high as in later relapsers [70].

Cambridge et al study in SLE revealed quantifiable circulating BAFF levels in 18/25 patients before BCDT. Three months after the therapy, BAFF levels were significantly increased, and by 6-8 months after the therapy, BAFF levels had fallen in association with return of B cells to peripheral blood, similar to observations in RA. In that study, serum BAFF levels at repopulation were similar in patients flaring and those

who remained well; response to RTX was shorter in patients with raised pre-BCDT BAFF levels [153].

Two mechanisms are probably involved in the increase in BAFF levels after BCDT. First one would be mechanistically related to the disappearance of most BAFF receptors present on the surface of B cells. A second one would be the delayed regulation of the BAFF mRNA transcription, leading to an increased transcription of BAFF mRNA. Serum BAFF levels after BCDT must be interpreted with caution, since they would not reflect the level of disease activity in these cases [154].

Increased BAFF levels after BCDT may then contribute to the survival and/or regeneration of autorreactive B cell populations capable of triggering clinical relapse, especially in RA later-relapsing patients after BCDT [70], as well as other autoimmune diseases such as SS or SLE [154]. Consideration of combination therapies with BCDT and BAFF inhibition might have the potential to extend clinical remission in these patients [70, 154].

B cell activating factor receptor (BAFF-R or BR3)

BAFF-R is a type III transmembrane protein of 184 aa residues expressed by all surface Ig⁺ B cells, but not by plasma cells [155]. BAFF-R binds BAFF exclusively [155].

BAFF-R deficient mice show profoundly reduced peripheral B cell numbers, completing their development until the transitional stage, but not further maturation, with reduced memory and marginal zone cells [156]. In humans, low or faulty

expression of BAFF-R in primary immunodeficiency results in elevated BAFF levels, low levels of serum IgM and IgG, increased numbers of transitional B-cells and strongly reduced T-independent immune responses; it is however not associated with severe infections, suggesting that human B cells are less dependent on BAFF-R signaling for maturation than murine B cells [157].

In humans, BAFF-R is expressed on the majority (>95%) of circulating B-cells, and binds only BAFF [158]. During B cell development, the capacity to bind BAFF emerges concomitant with BCR expression [159]. It has been demonstrated that transitional B cells exit the BM already expressing BAFF-R, but their BAFF-R expression levels are lower than mature B cells, therefore it will increase with further B cell maturation [160]. Occupation of BAFF-R by BAFF in resting B-cells is relatively constant [150]. Transitional human B-cells are most sensitive to pro-survival signals delivered by BAFF through BAFF-R prior to activation through the B-cell receptor (BCR) [161]. BAFF-R binding capacity increases through the transitional stages, and the highest BAFF-R expression is found in the follicular and marginal zone B cell subsets [162], with low levels of expression on GC B cells [155].

BAFF-R expression decreases when B-cells differentiate into ISC and is thought to be necessary for expression of BCMA. It is possible that, once B cells are committed to becoming a plasma cell, they lose BAFF-R to prevent a BAFF-mediated block in differentiation; the BAFFR/BCMA balance may be involved in a B cell's decision to differentiate into a memory B cell or a plasma cell [138].

BAFFR % and mean fluorescence intensity (MFI) expression was found to be normal in RA patients before RTX in a study analysing 208 RA patients before RTX treatment [57]. De la Torre et al investigated changes in BAFF-R expression in RA concordant and discordant patients after BCDT. They found that BAFF-R expression in naïve and memory B cells was reduced after rituximab and related to clinical relapse independently of circulating BAFF levels, hypothesizing that re-establishment of the disease in patients with RA after B cell depletion based on rituximab might involve preferential survival properties imbued to certain species of autoreactive B cells due to the unusual properties of their B cell receptor. BAFF-R expression might then be related to re-expansion of pathogenic species of B cells associated with relapse [71].

Transmembrane activator and Calcium signal modulating cyclophilic ligand interactor (TACI)

TACI differs by some unique structural features from BCMA and BAFFR [135]. TACI has 2 additional 5' exons, allowing the receptor to be expressed as 2 splice variants containing either one or two cysteine-rich extracellular domains, but only one seems functionally relevant [163]. TACI is able to bind APRIL and BAFF equally with high affinity [163], and is the only receptor that can bind BAFF/APRIL heterotrimers [164].

It is expressed on a sub-population of activated naïve B-cells (less than 25%), and its expression increases with activation through T-dependent and independent stimuli. It is up-regulated immediately upon B cell activation [138]. TACI is expressed

on virtually all memory-B-cells and variably on plasma cells and naïve mature B cells [138, 155].

The role of TACI in B-cell responses is complex with contrasting functional outcomes depending on context and conditions, as described by different authors and experiments in murine and human cells.

CSR is one of the mechanisms for mature B cells to diversify their Ig gene repertoire. Ig molecules acquire new effector functions by replacing the heavy chain constant region (CH) of IgM with that of IgG, IgA or IgE without changing antigen specificity [165]. CSR requires a primary signal from a TNF family member, such as CD40 ligand (CD40L) through a T-cell dependent pathway, or BAFF/APRIL which interact with TACI through a faster T-cell independent pathway [166].

TACI is involved in CD40-independent IgM production in co-operation with signalling through toll-like receptors (TLR) - largely through the ERK/JNK pathway - [167]. It plays a crucial role in initiating CSR through the T-cell independent pathway described [168]. B cells in TACI-deficient mice were unable to switch even in the presence of BAFF [169].

However, TACI also plays an important role in negative regulation of the mature B cell homeostasis. Mature B-cell numbers are increased in TACI-deficient mice [170]. Signalling by agonists through TACI can attenuate CD40 and BAFF-R induced Ab production. BAFF would stimulate B cells initially through BAFF-R, and then terminate excess B cell responses enhanced by BAFF-R and CD40 by upregulating TACI; BAFF would therefore regulate both T-cell dependent and independent B cell responses

through a dynamic balance between TACI and BAFF-R/CD40 signaling [171]. Moreover, TACI can directly induce apoptosis under certain conditions [170].

Follicular B cells express both BAFFR and TACI [162], however TACI is down-regulated on GC B cells through IL-21 signals, in the context of BCR cross-linking and CD40 co-stimulation, limiting their capacity for BAFF binding and retention. TACI is then critical for the retention of BAFF in follicular B cells, and its downregulation explains the disparate distribution of BAFF between follicles (BAFF-rich microenvironment) and GCs (BAFF-poor microenvironment) [152].

Sakurai et al found that, in vitro, TACI was a positive regulator for APRIL-induced IgA production, but a negative regulator for BAFF-induced B cell responses such as B cell proliferation and Ab secretion. They suggested a TACI negative regulation mediated via BAFF/TACI interaction, and a positive regulation via APRIL/TACI [172].

Lack of expression of TACI results in reduction in serum IgA and IgG levels, but increased B-cell numbers, attributed to the accompanying loss of inhibitory signals to BAFF-R and CD40 mediated responses seen with normal TACI expression. Defects in TACI are associated with two forms of human immunodeficiency, common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency [173, 174], suggesting the facilitanting role of TACI in B cell responses.

Other authors however suggest that TACI can enhance CD40 driven plasma cell differentiation [168, 175]. On the whole, TACI positive or negative regulatory effects

will probably depend on the status of differentiation and activation of the triggered B cell [135].

B-cell maturation antigen (BCMA)

BCMA is predominantly expressed in the Golgi apparatus [176], whereas cell surface expression appears to be low in normal human B cells. Expression of BCMA seems to be largely restricted to mature plasma cells in the bone marrow (BM) and secondary lymphoid organs [138], although short-lived plasmablasts can express both BAFF-R and BCMA. It is critical in maintaining the survival of BM plasmaloid plasma cells [177].

The role of this receptor acquires importance in multiple myeloma (MM) malignant B cells, where its surface expression is present and can contribute to the growth and survival of malignant plasma cells [178]. Several studies in SLE patients have also described a higher BCMA expression in lupus cells compared to HC [179-181].

STUDY JUSTIFICATION

Identifying the mechanisms involved in C-R and D-R patterns of relapse may help find markers of relapse that will allow patients to receive treatment pre-emptively, or alternatively suggest combination therapies between BCDT and new biologics targeting the BAFF-family, in order to prolong the time of remission.

Acquired defects in central tolerance are not sufficient to explain why some patients do not relapse immediately after B cell repopulation, needing a critical mass of autoreactive B cell expansion. Additional roles for expansion of autoreactive processes in the periphery are needed [182]. Therefore, later studies have focused on BAFF, which has an important role in B-cell maturation, homeostasis and survival [132]. BAFF levels increase after BCDT, decreasing at repopulation but not returning to pre-BCDT levels. A reduced BAFF-R expression has been identified at relapse, especially in C-R patients, probably involving early autoreactive B cells that overcome consequences of a lower BAFF-R expression, and therefore a reduced signalling through the BAFF/BAFF-R system [71].

This study also includes the comparison with TTP, another disease also managed with RTX, looking for similarities and differences in the B cell behaviour at repopulation after BCDT. It was decided to study TTP because it is also an autoimmune disease, directly associated with the production of autoantibodies (in this case against ADAMTS13), and has a good response to RTX. The advantage of studying this disease is that, unlike in RA, patients usually remain in long-term remission after a single cycle

of treatment, so the evolution of the B cell subpopulations and BAFF / BAFF-R system can be followed for years after receiving a single course of RTX.

Therefore, the study of the BAFF family, and the 3 BAFF-binding receptors described (BAFF-R, TACI and BCMA) may find differences between both patterns of relapse. Alternatively, BBR changes after BCDT may also be linked to the repopulation process after RTX and be present in other diseases treated with RTX, experimenting changes depending on the length of time after the treatment or after peripheral B cell repopulation. Therefore, my study has initially focused on BBR analysis in RA patients, especially on the possible correlation with length of time after repopulation. Subsequently, a comparative study between TTP and RA patients at repopulation after BCDT has been performed, and TTP patients in long-term remission after one cycle of RTX have been studied.

HYPOTHESIS:

The two different patterns of relapse after B cell repopulation following B cell depletion therapy (BCDT) based on Rituximab (RTX) may be explained by differences in the expression of B-cell activating factor (BAFF) binding receptors (BBRs).

OBJECTIVES:

Main Objective:

- Analyze B cell subsets, BAFF levels and BBR expression in healthy controls and RA patients, divided in three groups: pre-RTX, C-R and D-R. In patients studied after RTX, correlation of these data with time after peripheral B cell repopulation will be studied.

Secondary Objectives:

- Perform a retrospective observational study of the RA cohort treated with RTX at UCL, selecting patients with a good response to the 1st cycle of RTX and analyzing the pattern of relapse after that cycle.
- Compare results from RA patients at repopulation with TTP patients also treated with RTX, analyzing B cell subsets, BAFF levels and BAFF-R expression as well as the possible correlation with time after RTX treatment.

MATERIAL AND METHODS

Design

- Analysis of the cohort of RA patients treated with RTX at UCL:
 - Retrospective cohort study.

- Analysis of B cell subpopulations, serum BAFF levels and BBR expression in RA patients treated with RTX:
 - Cross sectional study of patients before receiving the therapy, and at relapse, either C-R or D-R pattern.
 - Longitudinal prospective study in 4 patients followed up before and after the therapy, where samples were obtained at the time of peripheral B cell repopulation and, if possible, at several points after repopulation.

- Analysis of B cell subpopulations, BAFF serum levels and BAFF-R expression in TTP patients, comparing the results with RA patients.
 - Cross sectional study.

Patients

- a) Analysis of the cohort of RA patients treated with RTX at UCL.

A retrospective descriptive cohort study of the RA cohort treated with RTX at UCL between the years 1998-2012 was performed. All patients fulfilled the 1987

revised American College of Rheumatology (ACR) criteria [2]. BCDT consisted of two infusions of 1 g RTX 1-2 weeks apart, each preceded by 100 mg i.v. methylprednisolone [74]. The study was approved by the UCL Ethics Committee, and all patients gave informed consent before entering the study.

For the analysis, all patients in the cohort showing a good response to the 1st cycle of RTX were selected, and the pattern of relapse after peripheral B cell repopulation was analysed.

All patients treated had severe disease activity (DAS28 > 5.1) previous to initiation of the therapy. DAS-28 (disease activity score) is a measure of disease activity in RA, based on 4 measures: painful joint count, swollen joint count, both from a simplified 28-joint count, patient global score of pain, and ESR laboratory measurement.

Clinical relapse was defined by (i) any return or increase of signs and symptoms caused by inflammation according to the consultant reviewing the patient, with or without (ii) a rise in C reactive protein (CRP) [62]. Of note, DAS-28 measurement is not routinely used at UCL to decide retreatment schedules, because it is considered to have several disadvantages: ESR measurement instead of CPR, joint count can be subjective, and does not distinguish between small and large joints [183]

b) Analysis of B cell subpopulations, serum BAFF levels and BBR expression in RA patients treated with RTX:

Blood samples were obtained from 5 healthy controls (HC) and 37 RA patients. Twenty patients with severe active disease (DAS28>5.1), were studied pre-rituximab (pre-RTX patients). Twenty-one patients undergoing clinical relapse after a good response to one or more courses of BCDT (post-RTX patients) were also studied, taking into account that four patients were followed longitudinally, therefore samples were available before the therapy and at relapse (patients 10, 11, 13, 14).

Post-RTX relapsing patients were divided in two groups, depending on the pattern of relapse identified:

- C-R: Relapse 0-3 months after 1st documented peripheral B cell repopulation: 11 patients.
 - D-R: Relapse \geq 4 months after 1st documented peripheral B cell repopulation: 10 patients.
- c) Analysis of B cell subpopulations, BAFF serum levels and BAFF-R expression in TTP patients, comparing the results with RA patients.

Blood samples were obtained from a total of 19 patients with TTP and 12 HC. Blood samples were available from Patient 1 both at acute admission and at B-cell return. We also selected 6 RA patients experiencing B cell repopulation after their 1st RTX cycle, for comparison with TTP repopulating patients.

Patients were all attending the Department of Haematology at UCL and treated on the basis of clinical need. RTX was delivered in at least 4 infusions of 375 mg/m² but

up to 8 infusions, if required, to reduce IgG anti-ADAMTS13 levels and to normalise ADAMTS13 activity [124]. Patients with RA received 2 infusions of 1g RTX 1-2 weeks apart. Time after RTX was defined as time since first rituximab infusion. The study had ethical approval and all patients gave informed consent before entering the study.

Patients with TTP were divided in 3 groups:

- Acute TTP before RTX (n=3): patients with a *de novo* acute presentation of TTP associated with significantly decreased ADAMTS13 activity and positive IgG anti-ADAMTS13 antibodies.
- First documented B-cell repopulation in TTP patients who had achieved clinical remission (sustained normal platelet counts $>150 \times 10^9/L$) following RTX therapy (n=5; one patient sample was available before the therapy and at repopulation).
- TTP patients in Remission (platelet count $>150 \times 10^9/L$) following B-cell return (n=12), as defined above.

Exclusion criteria

- Patients not responding to the first cycle of RTX, either because DAS-28 count did not decrease > 1.2 points, or because there was not a clinical or analytical improvement.

- Patients with persistent disease activity being treated with a second cycle of RTX 6 months after the first cycle.
- Patients who were lost to follow up before their first relapse after the therapy.
- Patients with no signs of repopulation after their first RTX cycle at the time of the study.
- Patients with incomplete data regarding CD19+ B cell determination.
- Patients who had been treated with RTX for other concomitant diseases (example: patients with a B cell lymphoma treated with RTX).
- Patients with an overlap syndrome consisting of RA and another autoimmune disease such as SLE or inflammatory myositis, since BAFF/BBR determinations can vary in those diseases.

Variables

Main variables:

- CD19+ lymphocyte determination by flow cytometry at the reference hospital laboratory. This determination was performed every 2-3 months at a specialized clinic, and it allows the calculations of:
 - Time from the first RTX infusion to the initiation of peripheral B cell repopulation.
 - Time from the initiation of peripheral B cell repopulation to disease relapse. According to this, patients are classified as C-R or D-R.

- Time between RTX administration and sample collection for TTP patients in long-term remission after RTX. It was calculated according to the date of the first RTX infusion.
- B cell phenotype determination, using 2 classifications depending on the study:
 - IgD/CD38 classification, dividing B cell subtypes into: naïve transitional B cells, naïve mature, IgD-resting memory, IgD+ resting memory, post-germinal centre (post-GC) B-cells and plasmablasts.
 - IgD/CD27 classification, dividing B cell subtypes into: naïve, double negatives, memory pre-switch, memory post-switch.
- Calculation of BAFF-R % expression in RA and TTP patients, and TACI and BCMA in RA patients. TACI and BCMA were not studied in TTP because RA studies did not show relevant results.
- Serum BAFF levels in RA and TTP patients.

Secondary variables:

- Demographics: age, sex.
- Years of disease in RA patients.

- RHF and ACPA results in RA patients, measured in the hospital laboratory by a particle agglutination test or an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) respectively.
- Previous and current therapies in RA patients at the beginning of RTX therapy.
 - o Steroids.
 - o DMARDs (MTX or others).
 - o AntiTNF drugs.
 - o CYC therapy, which was used in the first patients treated with RTX but discontinued later in the treatment protocol.
- Number of RTX cycles given.
- Calculation of BAFF-R mean fluorescence intensity (MFI) expression in RA and TTP patients, and TACI and BCMA MFI expression in RA patients.

Techniques

Assessment of B-cell depletion

Samples are collected routinely at the RTX clinic, and CD19⁺ B cells are calculated by flow cytometry at the hospital laboratory. The normal range for CD19⁺ B-cells used by the local pathology laboratory was 0.03-0.40x10⁹/Litre.

- Adequate peripheral blood B cell depletion is considered when CD19+ cells are $<5 \times 10^6 / L$
- B-cell repopulation is considered when CD19+ cells are $\geq 5 \times 10^6 / L$ or $\geq 0.5\%$ of the total lymphocyte count.

Next figure explains the usual “RA and RTX clinic” organization, especially the frequency at which patients are reviewed and parameters that are evaluated.

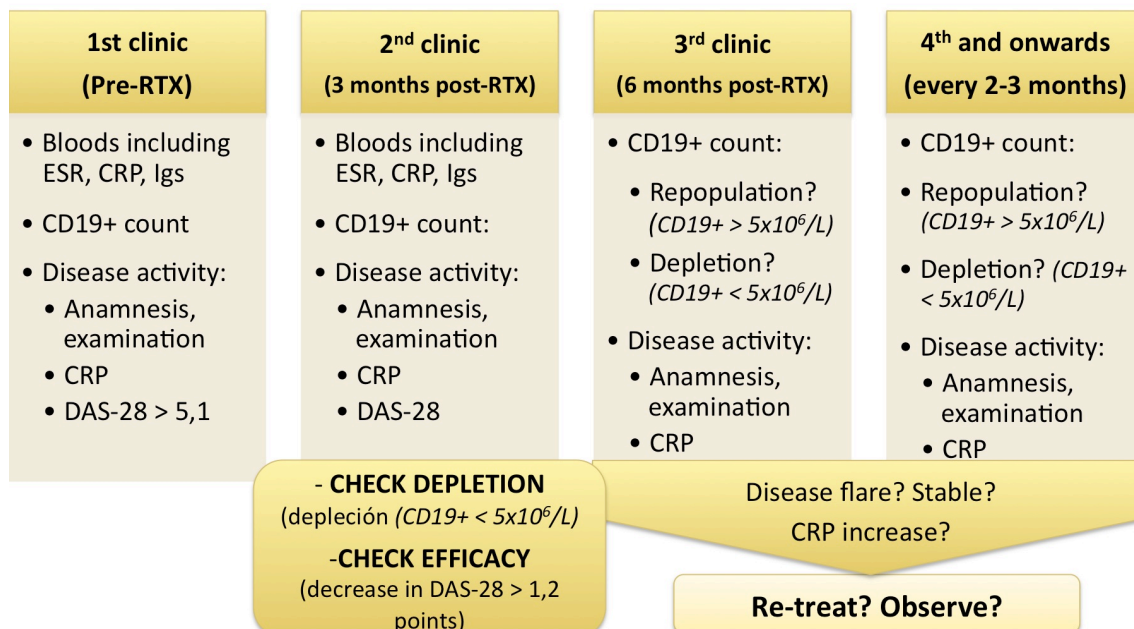


Figure 11: UCL RA and RTX clinic organization.

First consultation includes a global evaluation (clinical and analytical), focusing especially on ESR and CRP levels, and Igs. DAS-28 is calculated, which is determinant to decide if a patient can receive the therapy (in order to receive a biological therapy in the United Kingdom, DAS-28 must be > 5,1). A second evaluation is performed 3 months later, and focuses on checking full peripheral B cell depletion ($CD19 < 5 \times 10^6 / L$) and the efficacy of the therapy (DAS-28 should decrease > 1.2 points to consider efficacy of the treatment). At the third consultation and onwards, every 2-3 months usually, CD19+ lymphocyte count is checked, to distinguish whether repopulation has started or the patient is still depleted, and decide whether he needs to receive a new cycle of RTX or continue being reviewed periodically and retreated at first sign of disease relapse.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation and staining

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are characterized by having a single round nucleus, such as monocytes, macrophages and lymphocytes. They are isolated by *density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare, Sweden)*. Red cells and granulocytes are denser and pass through the gradient, while mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) remain on the ficoll forming a white ring that can be recovered from the interface [184].

Flow cytometry

Flow cytometry is a technique that determines both the number of cells positive for a particular marker and their intensity of expression; cells are required to be in suspension for analysis. Among other applications, it is used to identify lymphocyte populations (immunophenotyping); specific combinations of Ab labeled with different fluorochromes against surface and intracellular Ag are used for the studies. Fluorochromes are substances that absorb energy at a certain wavelength and emit light at a longer wavelength. They can be directly attached to monoclonal or polyclonal Ab and cellular proteins (direct labeling). Unconjugated monoclonal Ab can also be used, followed by a second Ab against the first one, which is fluorochrome-conjugated (indirect labeling).

During data collection at the cytometer, the population of interest must be defined, since lymphocytes are a minority of the leukocyte population, and the inclusion of non-lymphocyte cells can distort the data. Two parameters are used to do this selection: Forward scatter (size) and side scatter (granularity). The combination of both can distinguish between lymphocytes, granulocytes and monocytes (in the absence of red cells and platelets). Lymphocytes have the lowest forward and side scatter, and granulocytes have a very high side scatter.

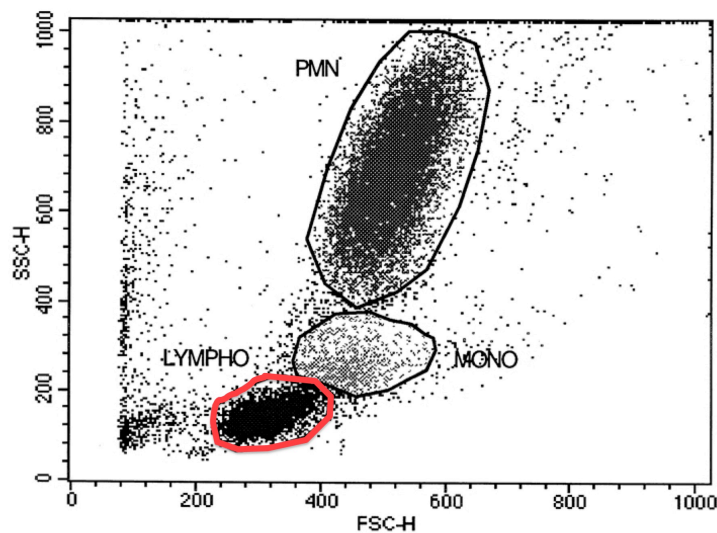


Figure 12: cell selection in flow cytometry according forward (FSC-H) and side scatter (SSC-H) Lymphocytes are surrounded by a red line. SSC-H: side scatter; FSC-H: forward scatter; Lympho: Lymphocytes; Mono: Monocytes; PMN: neutrophils. Figure from the article “Hydrogen Peroxide Production in Leukocytes during Cerebral Hypoxia and Reoxygenation with 100% or 21% Oxygen in Newborn Piglets”. Kutzsch et al.

Sample preparation

Samples were obtained as 10ml heparinised whole blood, isolating PBMCs by density gradient centrifugation (Ficoll-PaqueTM Plus; GE Healthcare, Sweden) as described. For the RA study cells were stained on same day of collection. For the TTP

study, PBMC were isolated from 10 ml heparinised whole blood and frozen in liquid nitrogen.

For fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis, PBMC (1×10^6 /sample) from patients and at least one healthy control were incubated with appropriate conjugated antibodies for 20 minutes at 4°C in the dark. Cells were washed and fixed with paraformaldehyde [185] 2% for 5 minutes and kept at 4°C in the dark until analysed by flow cytometry.

Phenotypic analysis

Immunophenotyping of PBMC was performed using matched combinations of anti-human murine monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein cyanin (PerCP-Cy5.5), or allophycocyanin (APC). All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, USA), eBioscience (San Diego, USA) or R&D Systems (Minneapolis, USA).

For B-cell analysis, combinations of anti-CD19 PerCP-Cy5.5, anti-IgD-FITC and anti-CD27 or anti-CD38-APC were used to define B-cell (CD19+) subsets; two different classifications were used in the two studies.

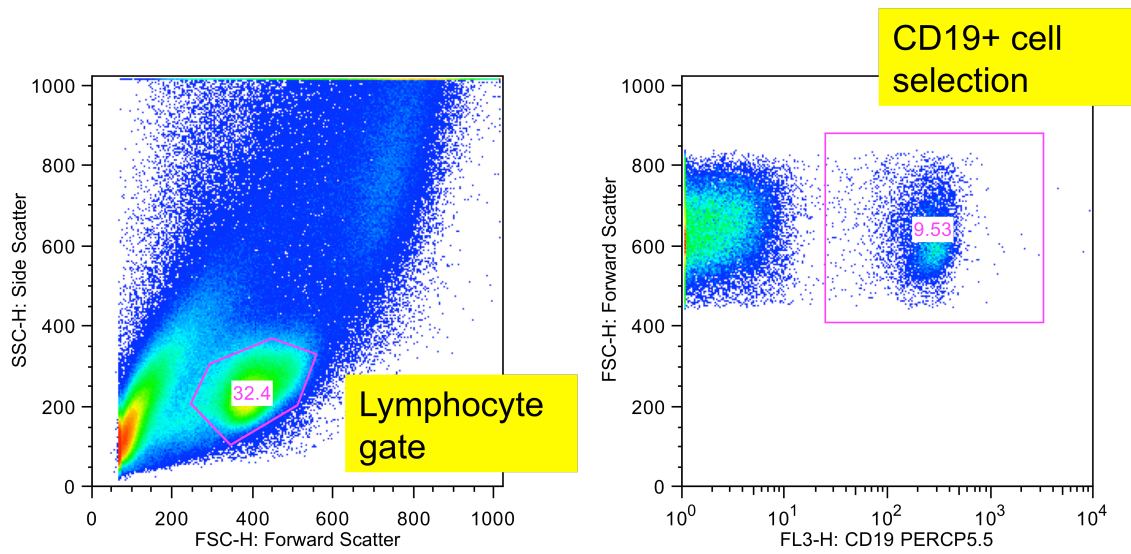


Figure 13: Initial gating on the lymphocyte population, and later selection of the CD19+ population.

For the RA study, B-cell sub-populations were defined on the basis of IgD/CD38 expression for CD19-gated cells, that is: naïve transitional (IgD+CD38++), naïve mature (IgD+CD38+), IgD- resting memory (IgD-CD38-), IgD+ resting memory (IgD+CD38-), post-germinal centre (GC) B-cells (IgD-CD38+) and plasmablasts (IgD-CD38++/+++). This classification was used for this study in order to add information about the plasmablast population [15].

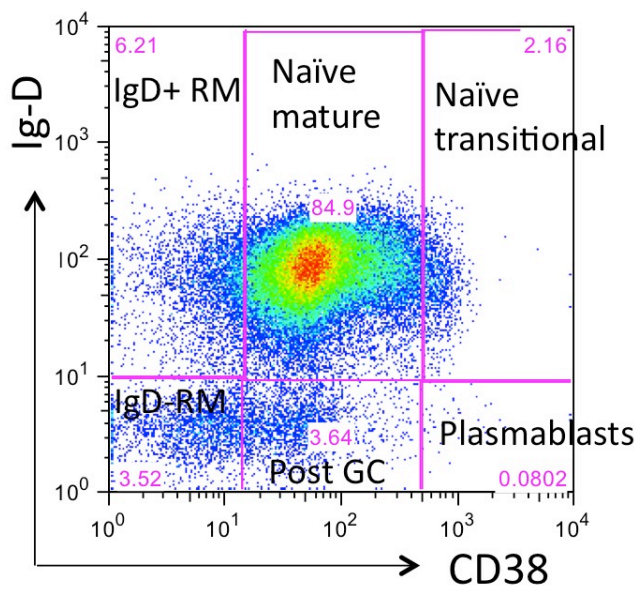


Figure 14: B cell classification defined on the basis of IgD/CD38 expression: naïve transitional, naïve mature, resting memory (IgD-RM), IgD+ resting memory (IgD+RM), post-germinal center (post-GC) and plasmablasts

For the TTP study, B-cell sub-populations were defined on the basis of IgD/CD27 expression for CD19-gated cells, identifying: naïve (IgD+CD27-), pre-switch memory (IgD+CD27+), switched memory (IgD-CD27+) and IgD-CD27- resting memory B-cells [12, 186].

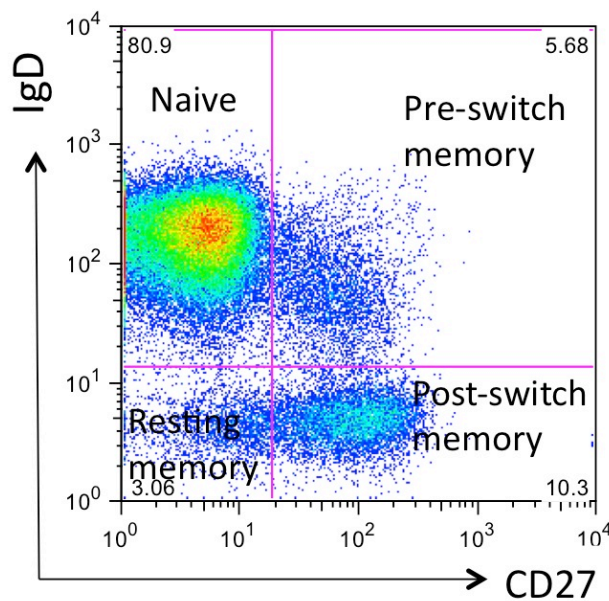


Figure 15: B cell classification defined on the basis of IgD/CD27 expression: naïve, pre-switch memory, switched memory and IgD-CD27- resting memory B-cells.

BBR expression study

BBRs expression on each subset was analysed for every B cell subpopulation using anti-BAFF-R-PE (11C1), anti-TACI-biotin with Streptavidin PE and anti-BCMA-PE. As shown in the RA results, TACI and BCMA results did not show significant differences in the subgroups of RA patients studied, therefore those determinations were not done in the TTP experiment, studying only BAFF-R expression.

BBR expression can be calculated by analysing the data obtained by flow cytometry, obtaining the percentage (number of cells positive for the receptor studied) and the mean fluorescence intensity (MFI) (number of receptors in each cell). Although both % and MFI expression for each BBR have been analysed, I have focused on analyzing % BBR expression because we have found less variability in results

compared to MFI calculations, which change depending on the experimental conditions and laser fluctuations depending on the day the sample was analysed.

The following figures are examples of flow cytometry for each receptor:

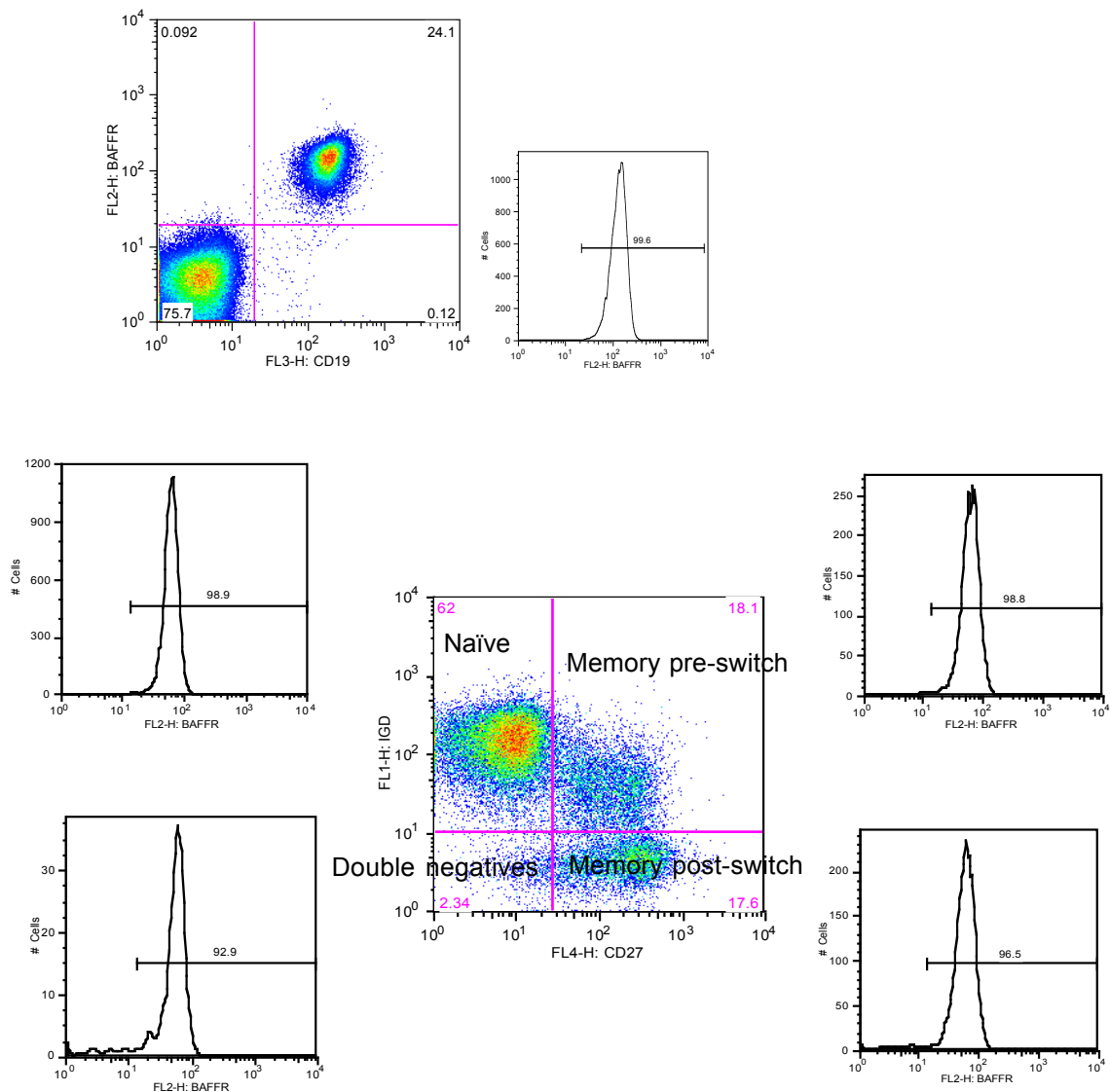


Figure 16: Example of a flow cytometry study representing BAFF-R expression in CD19+ cells. Representative plots of BAFF-R expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate and histograms showing percentage CD19+ cells expressing BAFF-R. The example shows how the majority of B cells express BAFF-R. Afterwards, BAFF-R expression is calculated for each B cell subpopulation, as shown in the corresponding histograms.

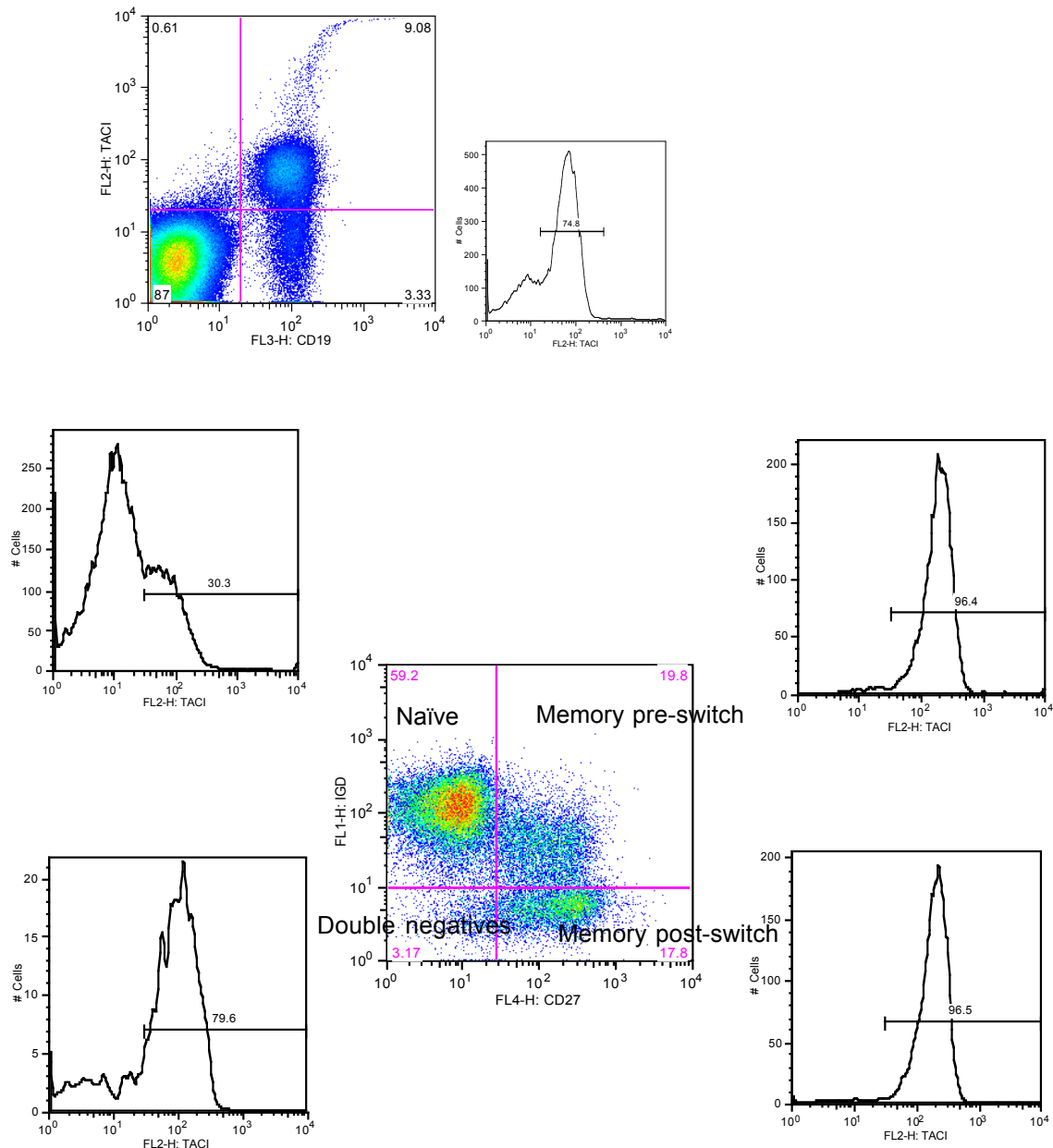


Figure 17: Example of a flow cytometry study representing TACI expression in CD19+ cells. Representative plots of TACI expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate and histograms showing percentage CD19+ cells expressing BAFF-R. Afterwards, TACI expression is calculated for each B cell subpopulation, as shown in the corresponding histograms. In the example memory B cell subpopulations have a high TACI+ve % expression, especially memory pre and post-switch B cells.

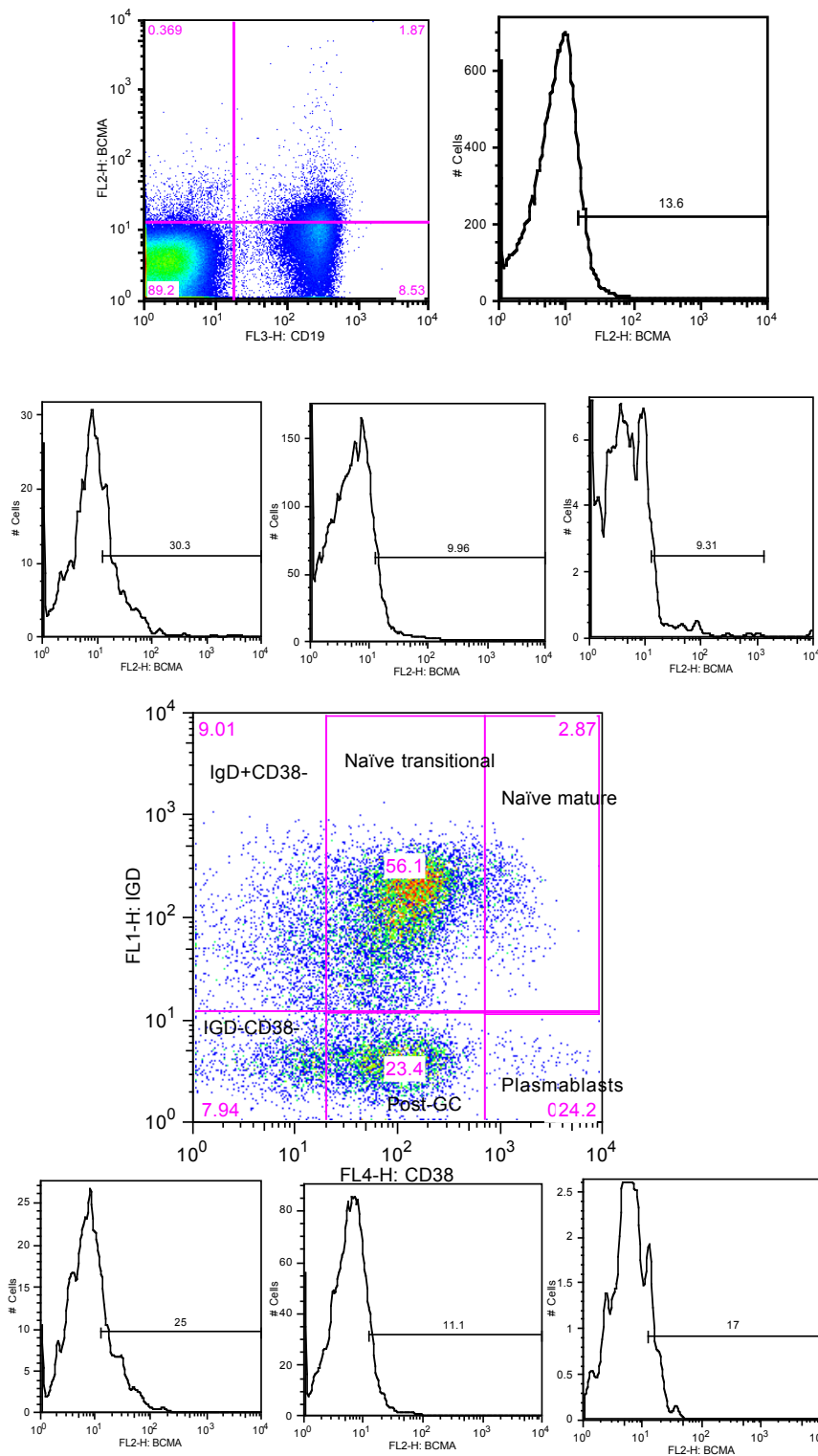


Figure 18: Example of a flow cytometry study representing BCMA expression in CD19+ cells.

Representative plots of BCMA expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate and histograms showing percentage CD19+ cells expressing BAFF-R. Afterwards, BCMA expression is calculated for each B cell subpopulation, as shown in the corresponding histograms. Plasmablasts should be the cells with a higher BCMA+ve expression, but % of plasmablasts in this example is very low, therefore results may not be representative.

Flow cytometer

300,000 events per sample gated on total lymphocytes were acquired with a FACSCaliBur (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Data analysis

Data were analysed with FlowJo (TreeStar, Stanford University, CA). Absolute cell counts were calculated from routine lymphocyte counts at each time point.

Measurement of BAFF

Serum BAFF levels were quantified in healthy controls and RA and TTP patients, using Human Quantikine® BAFF/BLyS Immunoassay ELISA kit (R&D Systems (Minneapolis, USA)).

For the RA experiment, mean \pm SD for normal sera (n=36) given in this batch of kits was given as 1.17 \pm 0.28 ng/ml (range 0.67–2.45 ng/ml).

For the TTP experiment, mean \pm 3SD for normal sera given by the manufacturer was 1.17 \pm 0.84 ng/ml (2.01ng/ml). This was therefore used as upper level for cut-off for normal range.

Statistics

Statistics were performed using the programs Graph Pad Prism 6, San Diego, USA, and SPSS Statistics software (SPSS IBM. Armonk, NY, EEUU). Mean, median and range (minimum and maximum) were calculated for all quantitative variables. For categorical variables, such as the treatments patients had received, the frequency in the cohort was calculated, as well as the occurrence percentage. A T Student test was applied for the comparison between the concomitant treatments in patients receiving RTX and the time of depletion after having had RTX.

Frequencies of B-cell subsets and BBR expression (% and MFI) in patient and control groups were compared using nonparametric Mann-Whitney U test GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA).

Correlation statistics were used to determine any relationship between serum BAFF levels and expression (% and MFI) of BBRs, length of time after repopulation or after RTX, or between B cell repopulation and disease relapse, as well as and correlations laboratory parameters.

RESULTS

Patterns of relapse in the RA cohort treated with RTX at UCL

271 patients have received RTX at UCL Rheumatology department between 1998 and 2012. Total patient-years follow up was 886 and total number of cycles administered was 910. Patients with good response after 1 cycle of RTX were selected, a total of 168 patients who had been followed up at least until their first relapse, which occurred 4 to 45 months after the first cycle.

Seventy-eight % (n: 132) were women, mean age at the beginning of the therapy was 56 years, median was 58 years (range 18-85); mean disease duration at the beginning of the therapy was 15 years, median was 12 years (range 1-56);

Most patients were positive for RhF (154; 91 %) and ACPA antibodies (137; 81 %); ACPA determination was not available for 11 patients. Mean and median number of RTX cycles received was 4 (range 1-11).

Previous therapy received by the patients included MTX in 157 patients (93 %). Other DMARDS had been used in 153 patients (91 %), including sulfasalazine, leflunomide, chloroquine, hidroxicloroquine, azathioprine, cyclosporine, gold, CYC, D-penicillamine and chlorambucil. Mean and median number of previous DMARDS including MTX was 3 (range 0-6): previous anti-TNF therapy had been used in 110 patients (65 %), including etanercept, infliximab, adalimumab and certolizumab pegol; mean number of previous anti-TNF drugs was 1.24, median number was 1 (range 0-3).

Concomitant therapy with MTX was observed in 71 patients (42 %), whereas 42 patients (25 %) were receiving other concomitant DMARDs; oral concomitant steroids were given in 47 patients (28 %); CYC was given to 25 patients (15 %), it was given as 1 single intravenous cycle in 24 patients, and orally in 1 patient. Patients' characteristics are summarized in table 3.

Table 3: Demographics and previous and concomitant therapy from the RA cohort treated with RTX at UCL

CHARACTERISTICS	n = 168
Mean age (range)	56 years (18-85 years)
N° women (%)	132 (78 %)
Mean disease duration (range)	15 years (1-56 years)
RHF +, n° (%)	154 (91 %)
ACPA +, n° (%)	137 (81 %) *
Mean Number of RTX cycles (range)	4 (1-11 cycles)
PREVIOUS THERAPY	
MTX, n° (%)	157 (93 %)
Other DMARDs	153 (91 %)
Anti-TNF, n° (%), Mean number and range	110 (65 %) 1,24 (0-3 anti-TNF)
CURRENT THERAPY	
Oral steroids, n° (%),	47 (28 %)
MTX n° (%)	71 (42 %)
Other DMARDs n° (%)	42 (25 %)
CYC n° (%)	25 (15 %)

* ACPA not available for 11 patients.

Full depletion (CD19+ count $<5 \times 10^6$ / L) was documented 3 months after BCDT in the 168 patients selected. Mean time to repopulation was 7,3 months (range 3-20 months); mean time to relapse was 10,4 months (range 3-67 months). Two of the patients studied still remain stable at the time of data collection, at 28 months and 38 months after their first RTX cycle, and have not needed retreatment yet.

Then the analysis focused on the time until peripheral B cell repopulation, that is the first timepoint where B cells were again detectable in peripheral blood, and the time from repopulation to relapse. According to these two concepts, patients were divided in two patterns of relapse:

- C-R in 118 patients (70 %), with a mean time to repopulation of 7,1 months (range 3-20 months), and a mean time to relapse of 7,7 months (range 3-20 months).
- D-R in 50 patients (30 %), with a mean time to repopulation of 7,8 months (range 3-20 months), and a mean time to relapse of 17,4 months (range 6-67 months).

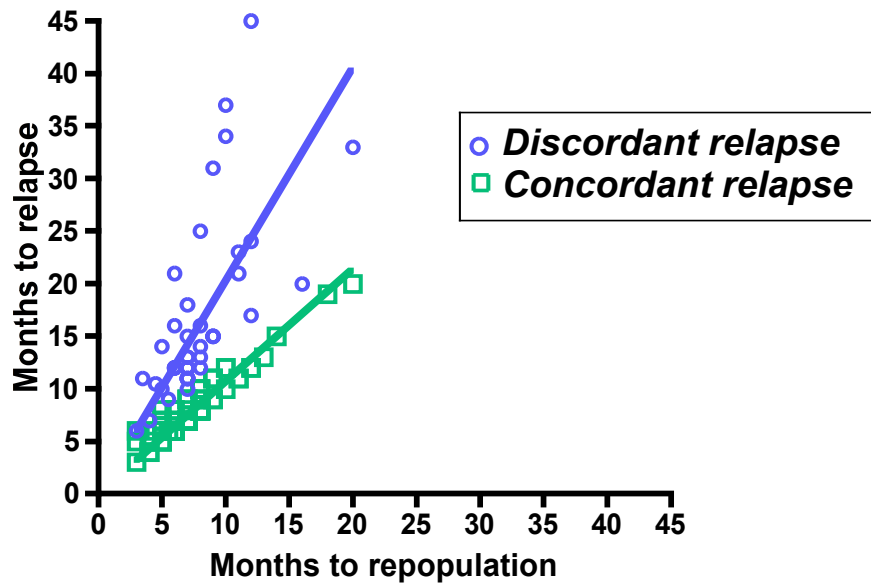


Figure 19: Concordant and discordant relapse graph:

This graph shows the correlation between time to peripheral B cell repopulation and time to relapse. Green dots and line represent concordant patients relapsing <3 months after repopulation, whereas purple dots and line represent discordant patients, relapsing > 3 months after repopulation.

No differences were observed between patients taking MTX or oral DMARDS and those not receiving concomitant therapy. However, patients being treated with concomitant CYC over their first cycle showed a longer duration of depletion and a longer time to relapse than those who did not receive it ($p < 0,05$).

Expression of BBRs on B cell subsets from RA patients relapsing after BCDT

37 RA patients were selected for this analysis, including 20 pre-BCDT RA patients and 21 relapsing after BCDT; four patients were followed longitudinally and had available samples before and after RTX. Post-RTX patients were divided in two groups, according to their pattern of relapse: C-R and D-R.

Mean age for RA patients in this study was 58 (range 27-80) and mean disease duration was 12,5 years (range 1-33). All patients had erosive disease. There were 5 male patients.

Patients' characteristics are shown in the tables 4 and 5. Three pre-RTX patients were seronegative for both RHF and ACPA; all post-RTX patients were seropositive either for RHF or ACPA. Mean number of cycles for post-RTX relapsing patients was 2,6; median was 2, range 1-7.

Table 4: RA patients before RTX therapy: baseline characteristics

Patient	Age	Gender	Years of disease	RHF	ACPA
1	62	F	4	+	+
2	79	F	2	+	+
3	68	M	4	neg	+
4	68	F	3	+	+
5	72	M	1	+	+
6	54	F	17	+	neg
7	61	F	5	neg	+
8	31	F	8	+	+
9	49	F	16	neg	+
10	45	F	12	+	+
11	62	F	3	+	+
12	32	F	2	neg	neg
13	80	F	22	+	+
14	61	F	4	+	+
15	27	F	6	neg	+
16	68	F	4	+	+
17	59	F	3	+	+
18	60	F	4	neg	+
19	48	F	3	neg	neg
20	56	F	9	neg	neg

Tabla 5: RA patients relapsing after RTX: characteristics

Patient	Age	Gender	Years of disease	RHF	ACPA	N° cycles
CONCORDANT RELAPSE						
11*	62	F	3	+	+	1
13*	80	F	22	+	+	1
14*	61	F	4	+	+	1
21	56	M	20	+	+	3
22	63	F	23	+	+	3
23	72	F	15	+	+	5
24	40	F	3	+	+	1
25	56	F	NA	+	+	3
26	71	F	13	+	neg	6
27	37	F	7	+	+	2
28	39	F	23	+	+	7
DISCORDANT RELAPSE						
10*	45	F	12	+	+	1
29	70	M	30	+	+	1
30	68	F	23	+	+	3
31	34	F	18	+	+	2
32	46	F	NA	+	+	3
33	67	F	21	+	+	2
34	77	F	33	+	+	4
35	59	F	31	+	+	2
36	54	M	30	neg	+	2
37	62	F	25	+	+	2

* Patients 10, 11, 13 and 14 were analyzed before and after the therapy

1. B cell phenotypes in patients relapsing after rituximab

The figure below shows representative plots from a patient was followed longitudinally, before BCDT, at repopulation after BCDT, 3 months later (at that point she was not retreated because her RA remained in remission), and 6 months after peripheral B cell repopulation, when she relapsed and was retreated. As shown in the figure, repopulation clearly occurs with a majority of naïve transitional B cells, which progressively turn into naïve mature B cells. All patients followed longitudinally behaved similarly.

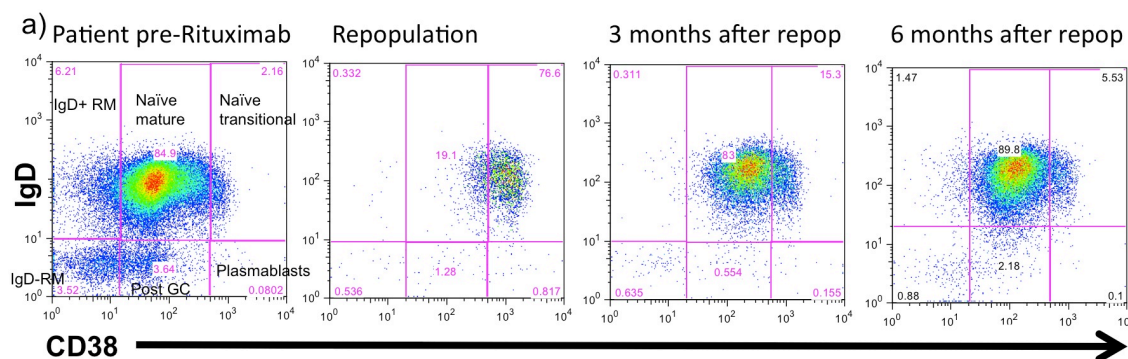


Figure 20: Example of a citometry plot showing B-cell phenotypes.

Phenotypes previous to BCDT show the usual B cell distribution (naïve transitional, naïve mature, IgD-resting memory (IgD-RM), IgD+ resting memory (IgD+RM), post-germinal center (post-GC) and plasmablasts; at repopulation there is an increased % of naïve transitional B cells. The later sequences allow us to show the persistence of increased naïve B cells, although they progressively turn into naïve mature B cells. This patient was stable at repopulation and when she was reviewed 3 months later; she ultimately relapsed 1 year after the first RTX infusion (Patient with a D-R pattern).

Analysis of B-cell phenotypes defined by IgD/CD38 expression in pre and post-RTX patients is shown in percentages and absolute numbers in the following figures. Figures highlight the statistical analysis comparing values in patients C-R and D-R. Differences were also significant comparing those with HC or pre-RTX patients, as

expected in patients undergoing repopulation after BCDT, however they have not been plotted so as to avoid confusion.

The following results compare median values. C-R patients showed a significant higher percentage of transitional B cells when compared with D-R patients (24.7 %, range 8.9-79.5 % vs 5.4 %, range 0.6-9.2 %, $p<0.001$); absolute median numbers of transitional B cells showed the same trend in C-R compared with D-R patients, although comparison was not significant (10.5×10^6 cells, range $0.5\text{--}36 \times 10^6$ vs 5.9×10^6 cells, range $0.1\text{--}19 \times 10^6$).

D-R patients presented significantly higher median percentages and absolute numbers of naïve mature B cells compared to C-R patients (83.7 %, range 57.6-91.9 % vs 47.6%, range 3-86.7 %, $p<0.01$ and 87.8×10^6 cells, range $7.2\text{--}331 \times 10^6$ vs 6.4×10^6 cells, range $0.1\text{--}349.7 \times 10^6$, $p<0.05$).

Median percentages and absolute values of IgD+ resting memory B cells were significantly higher in D-R patients compared to C-R patients (3.2 %, range 1-6.9 % vs 0.6 %, range 0-2.1 %, $p<0.01$; 3.2×10^6 cells, range $0.5\text{--}12.3 \times 10^6$ vs 0.1×10^6 cells, range $0\text{--}8.7 \times 10^6$, $p<0.01$). Median absolute values of post-GC B cells were also significantly higher in those patients compared to C-R patients (3.1×10^6 cells, range $1.7\text{--}18.3 \times 10^6$, vs 1.1×10^6 cells, range $0.1\text{--}4.4 \times 10^6$, $p<0.01$). Percentages and absolute numbers of IgD- resting memory B cells and plasmablasts were not statistically significantly different between groups.

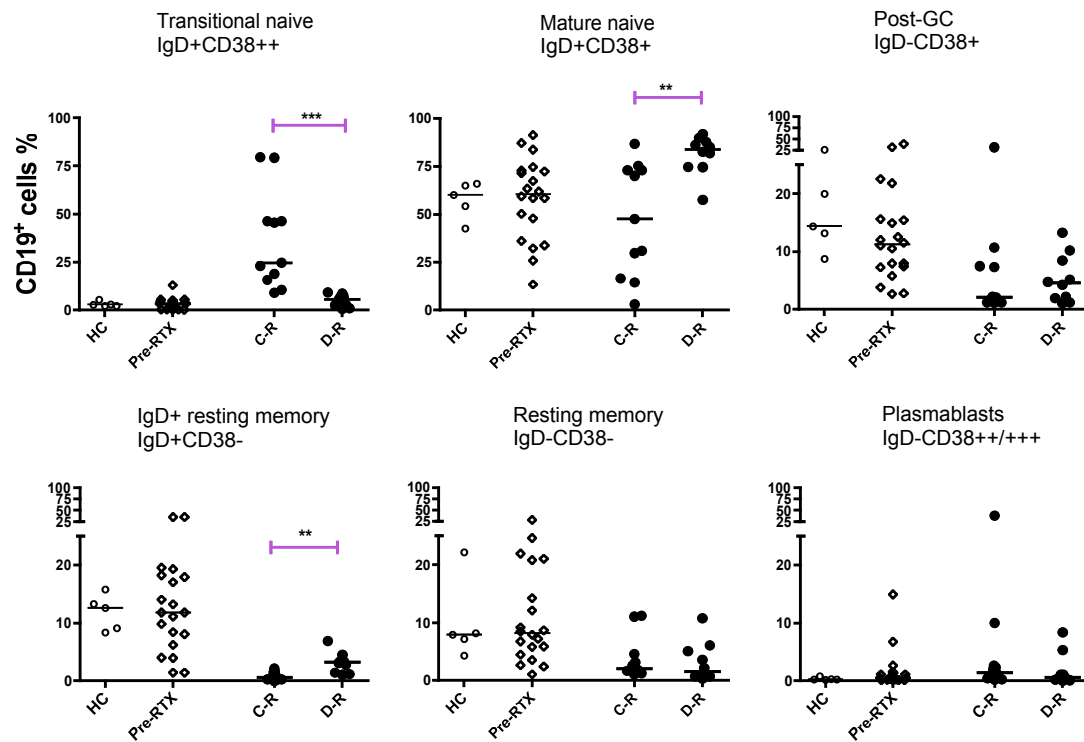


Figure 21: Percentages for B-cell phenotypes defined by IgD/CD38 expression in pre and post-RTX patients.

C-R patients had significant higher % of transitional B cells than D-R patients. D-R patients had a significantly higher % of naïve mature and IgD+ resting memory B cells compared to C-R patients (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

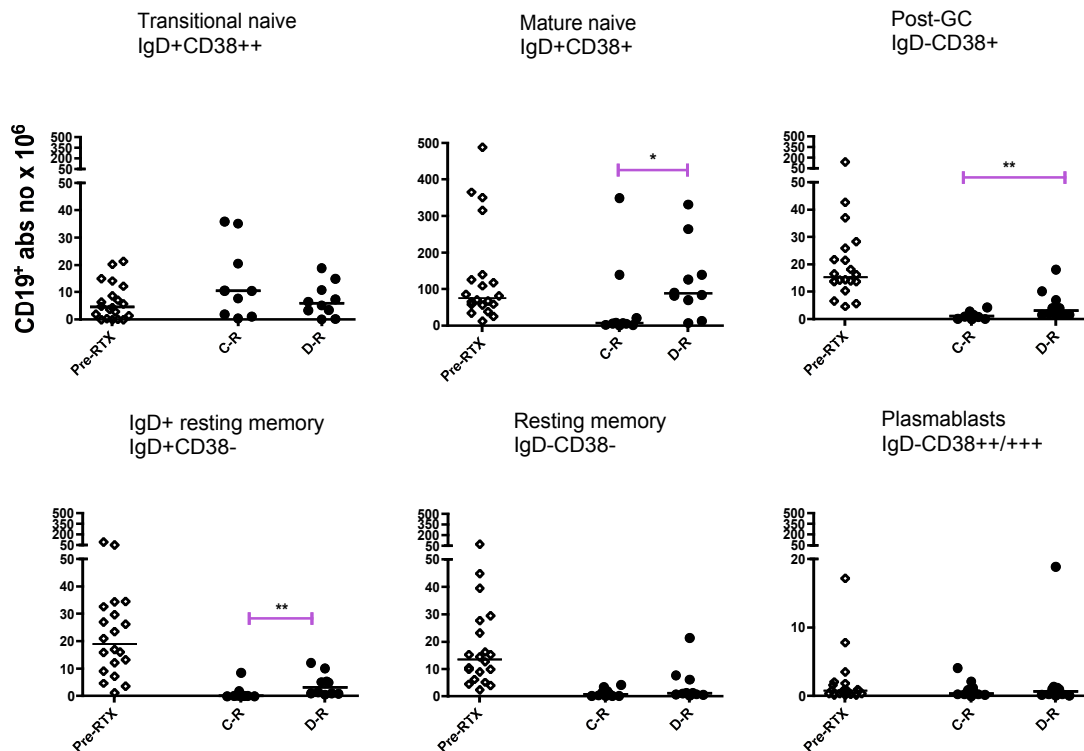


Figure 22: Absolute numbers for B-cell phenotypes defined by IgD/CD38 expression in pre and post-RTX patients.

D-R patients showed significantly higher absolute numbers of naïve mature, post-GC B cells and IgD⁺ resting memory B cells compared to C-R patients (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

2. Is there a correlation between B cell phenotypes and the time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse in post-RTX RA patients?

Phenotype analysis in patients who had experienced a relapse of the disease <7 months after repopulation showed a direct correlation with time after repopulation in naïve mature B cells ($r^2=0.46$, $p<0.01$) and IgD⁺resting memory ($r^2=0.34$ $p<0.05$), whereas there was an inverse correlation in naïve transitional B cells ($r^2=0.43$, $p<0.01$). There was no correlation between absolute numbers of B cells and time after repopulation in any B cell subpopulation (*data not shown*).

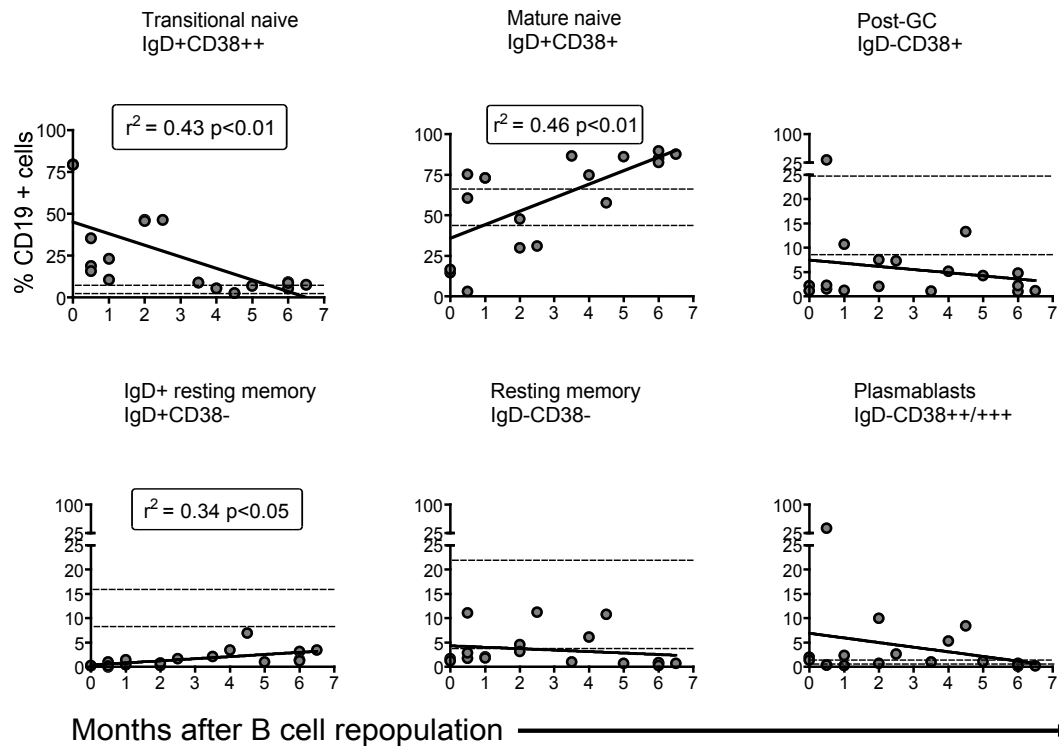


Figure 23: Correlation between phenotype % and time between peripheral B cell repopulation after RTX and clinical relapse

A significant correlation was found between the time (months) after repopulation and the % naïve mature and IgD+ resting memory B cells, and a significant inverse relationship was found with % naïve transitional B cells. Dotted areas indicate the normal range of values given by respective B cell subpopulations in healthy controls.

3. BAFF-binding receptor expression in RA patients pre-RTX and post-RTX at relapse.

Expression of each BBR on the different B-cell sub-populations described above was determined in HC, pre-RTX patients and post-RTX with a C-R and a D-R pattern.

a) BAFF-R expression

BAFF-R+ve % expression did not reveal differences between HC and pre-RTX patients; however it was significantly decreased in all post-RTX patients, showing a

deeper decrease in C-R patients, which was also significantly different when compared with D-R patients. The following figure shows %BAFF-R+ve expression in all B cell subpopulations in the 4 groups studied.

Significant differences were found in %BAFFR+ve expression in post-RTX patients compared to HC and pre-RTX patients in all B-cell subpopulations except for plasmablasts. When comparing HC with C-R patients, differences were more notable in naïve transitional B cells (95 %, range 86.1-97.4 % vs 46.7 %, range 14.5-78.4 %, $p<0.001$), naïve mature (99.3 %, range 98.6-99.4 % vs 61.3 %, range 30.9-88.8 %, $p<0.001$) post-GC cells (97.9 %, range 91.9-98.3 % vs 49.8 %, range 18-66.3 %, $p<0.001$) and IgD- resting memory (94.8 %, range 91.4-95.9 vs 61.8 %, range 9.1-78.6 % $p<0.001$). When comparing pre-RTX and C-R patients, differences were more evident in naïve transitional B cells (95.7 %, range 35.3-100 % vs 46.7 %, range 14.5-78.4 %, $p<0.001$), naïve mature (99 %, range 79.2-100 % vs 61.3 %, range 30.9-88.8 %, $p<0.001$), post-GC (98 %, range 80.8-99.8 % vs 49.8 %, range 18-66.3 %, $p<0.001$) and IgD- resting memory (98.4 %, range 66.7-100 % vs 61.8 %, range 9.1-78.6 %, $p<0.001$).

There were also significant differences comparing HC or pre-RTX patients with D-R patients ($p<0.05$). When HC were compared with D-R patients, most important differences were noted in naïve mature B cells (99.3 %, range 98.6-99.4 % vs 95.1 %, range 74.9-98.8 %, $p<0.01$) and post-GC cells (97.9 %, range 91.9-98.3 % vs 85.8 %, range 50-97 %, $p<0.01$). When pre-RTX and D-R patients were compared, differences were more evident in post-GC cells (98 %, range 80.8-99.8 % vs 85.8 %, range 50-97 %, $p<0.01$), IgD+ resting memory (96.9 %, range 72.5-100 % vs 88.4 %, range 61-96.8

%, $p < 0.01$) and IgD- resting memory (98.4 %, range 66.7-100 % vs 92.2 %, range 43.8-97.3 %, $p < 0.01$).

Significant differences in %BAFFR+ve expression were also observed between both post-RTX groups in the naïve transitional subpopulation (86 %, range 44-93.9 % vs 46.7 %, range 14.5-78.4 %, $p < 0.01$), naïve mature (95.1 %, range 74.9-98.8 % vs 61.3 %, range 30.9-88.8 %, $p < 0.001$) post-GC (85.8 %, range 50-97 % vs 49.8 %, range 18-66.3 %, $p < 0.001$) and the IgD- resting memory B cells (92.2 %, range 43.8-97.3 % vs 61.8 %, range 9.1-78.6 %, $p < 0.05$).

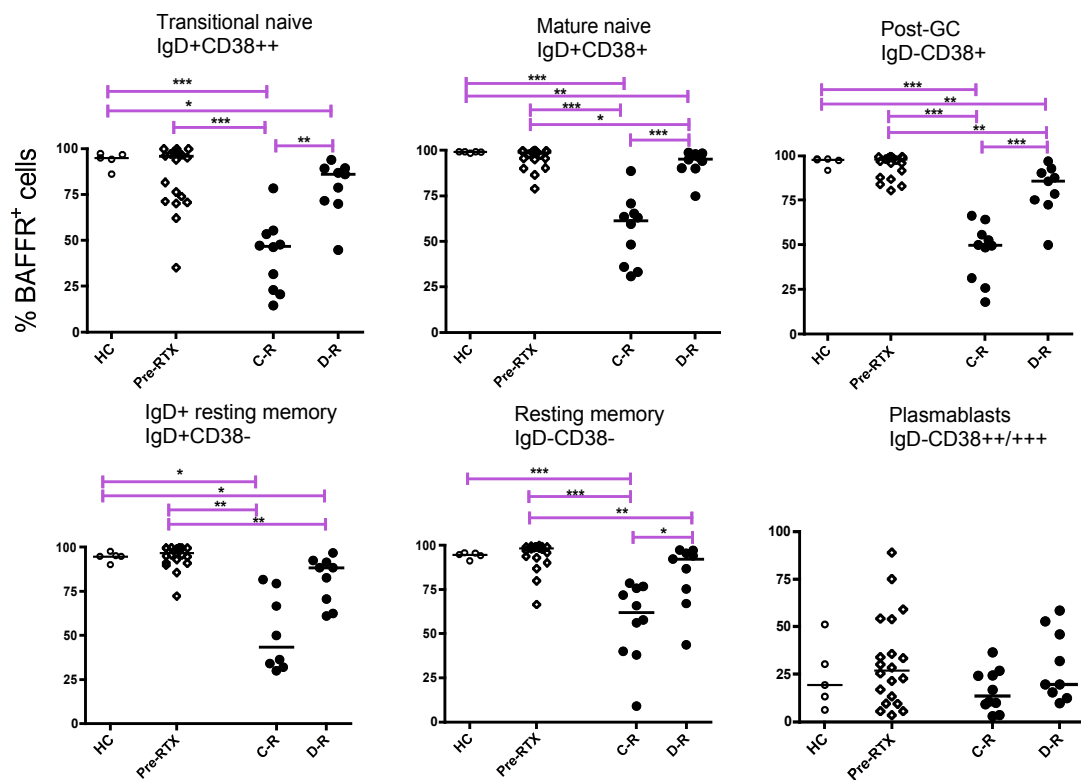


Figure 24: BAFF-R+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. Significant differences were observed in all B cell subpopulations except for plasmablasts, when comparing post-RTX patients with HC and pre-RTX patients. There were also significant differences in %BAFFR+ve expression between post-RTX patients in the naïve transitional subpopulation ($p < 0.01$), naïve mature and post-GC subpopulations ($p < 0.001$) and IgD- memory resting population ($p < 0.05$) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

BAFF-R MFI expression was significantly lower in all subpopulations in post-RTX patients compared to HC and pre-RTX patients. When HC were compared with C-R patients, main differences were found in naïve transitional B cells (50.6 MFI, range 49.1-80.1 vs 16.1 MFI, range 13-20, $p<0.001$), naïve mature (63.1 MFI, range 58.1-96.5 vs 17.2 MFI range 13.7-47.6, $p<0.001$), post-GC (78.6 MFI, range 59.5-96.8 vs 17.3 MFI, range 14.2-22.5, $p<0.001$), IgD- memory resting (63 MFI, range 46.4-80.7 vs 16.2 MFI, range 12.4-21.6, $p<0.001$) and plasmablasts (38.2 MFI, range 22-54 vs 13.3 MFI, range 10.4-21.7, $p<0.001$). When comparing pre-RTX and C-R patients, more evident differences were seen in naïve transitional B cells (43.8 MFI, range 14.1-135 vs 16.1 MFI, range 13-20, $p<0.001$), naïve mature (51.6 MFI, range 16.1-154 vs 17.2 MFI, range 13.7-47.6, $p<0.001$), post-GC (55.1 MFI, range 14.8-179 vs 17.3 MFI, range 14.2-22.5, $p<0.001$), and IgD+ memory resting (47.4 MFI, range 15.7-131 vs 20.9 MFI, range 14.7-37.6, $p<0.001$).

When HC were compared with D-R patients, more notable differences in BAFF-R MFI expression were found in naïve transitional B cells (50.6 MFI, range 49.1-80.1 vs 29.1 MFI, range 19.1-43.8, $p<0.001$), naïve mature (63.1 MFI, range 58.1-96.5 vs 30.7 MFI, range 20.5-44.8, $p<0.001$), post-GC (78.6 MFI, range 59.5-96.8 vs 33.4 MFI, range 17.5-51.7, $p<0.001$) and IgD+ memory resting (61.1 MFI, range 50.1-79.7 vs 30.2 MFI, range 20.9-42, $p<0.001$). When comparing pre-RTX and D-R patients, main differences were seen in naïve mature B cells (51.6 MFI, range 16.1-154 vs 30.7 MFI, range 20.5-44.8, $p<0.01$), IgD+ memory resting (47.4 MFI, range 15.7-131 vs 30.2 MFI, range 20.9-42, $p<0.01$) and plasmablasts (33.9 MFI, range 14.1-106 vs 19.9 MFI, range 13.7-28.2, $p<0.01$).

BAFF-R MFI was also significantly lower in C-R compared with D-R patients, especially in naïve transitional B cells (16.1 MFI, range 13-20 vs 29.1 MFI, range 19.1-43.8, $p < 0.001$), post-GC (17.3 MFI, range 14.2-22.5 vs 17.3 MFI, range 14.2-22.5, $p < 0.001$), IgD-resting memory (16.2 MFI, range 12.4-21.6 vs 36.6 MFI, range 17.7-52.8, $p < 0.001$) and plasmablasts (13.3 MFI, range 10.4-21.7 vs 19.9 MFI, range 13.7-28.2, $p < 0.001$).

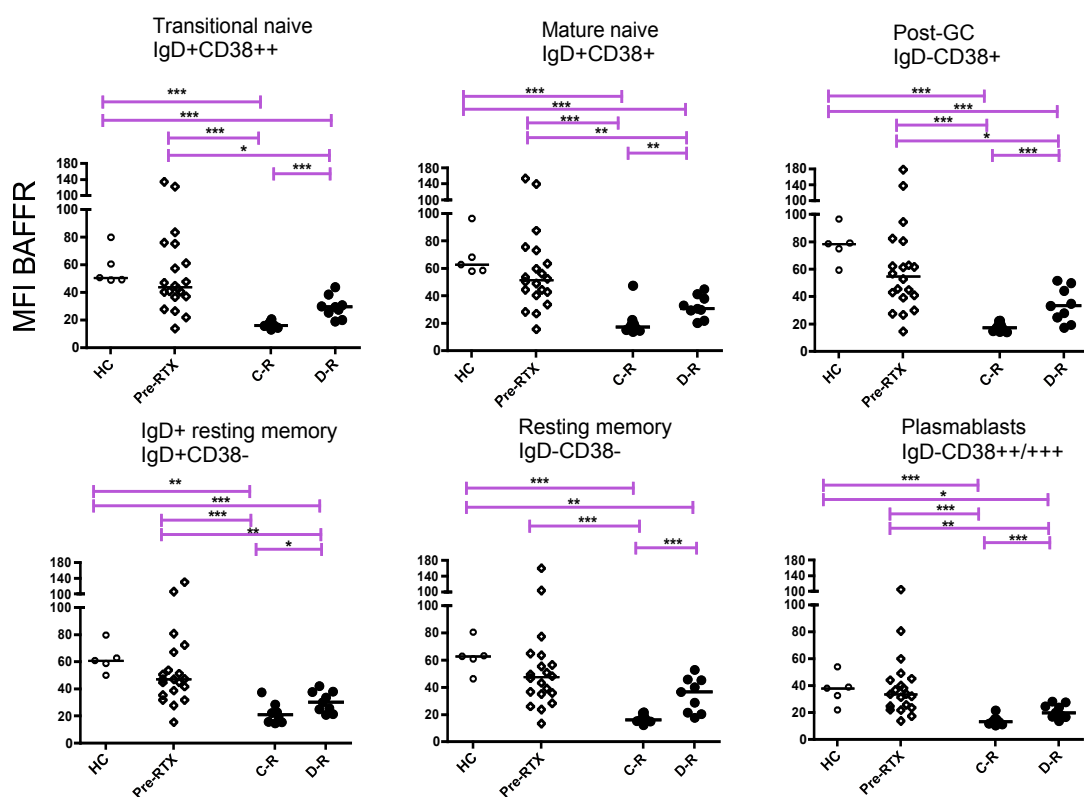


Figure 25: BAFF-R MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. BAFF-R MFI was significantly reduced in all B cell subpopulations in both post-RTX relapsing groups compared to HC or pre-RTX patients. It was also significantly lower in C-R patients compared with D-R patients, with $p < 0.001$ in naïve transitional, post-GC, IgD-resting memory B cells and plasmablasts (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Next figure shows flow cytometry plots from a patient followed up before and after the therapy. Peripheral B cell repopulation started 6 months after her RTX first cycle, but she relapsed 3 months later, therefore her BAFF-R expression evolution was

followed up. BAFF-R % and MFI expression was lowest at repopulation, increasing progressively some months later. Results were similar in the other patients followed longitudinally who did not relapse immediately after repopulation.

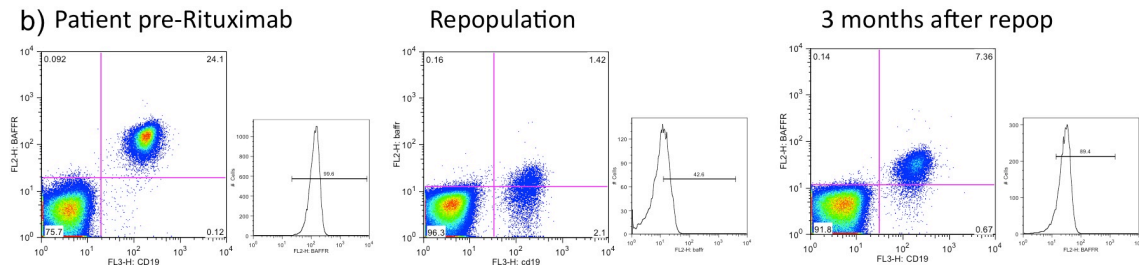


Figure 26: Flow cytometry plot of BAFF-R expression in a patient pre and pos-RTX

The graph shows BAFF-R expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate, and the histogram showing relative expression of BAFF-R within the gated CD19+ population. The example shows a first graph before receiving the treatment, where the majority of CD19+ B cells express BAFF-R. At repopulation, which occurred 6 months after the therapy, BAFF-R expression was considerably reduced. Patient relapsed 3 months later, allowing a longer follow-up before being retreated, seeing that BAFF-R expression had progressively increased 9 months after having received RTX.

b) TACI expression

Next figure shows that naïve (both transitional and mature) and plasmablasts B-cell populations in all patient groups and HC were similar with respect to %TACI+ve expression. Analysis of the memory B cell subsets showed significant differences between HC and patient groups. %TACI+ve expression in post-GC B cells was significantly decreased in all patient groups compared to HC: 90.1 %, range 85.1-93.3 % vs 73.8 %, range 36.6-93.9 %, $p < 0.05$ for the comparison between HC and pre-RTX patients; 90.1 %, range 85.1-93.3 % vs 62.7 %, range 41.8-88.3 %, $p < 0.01$ for the comparison between HC and C-R patients, and 90.1 %, range 85.1-93.3 % vs 63.9%, range 43.3-84.9 %, $p < 0.01$ for the comparison between HC and D-R patients.

%TACI+ve expression in IgD- memory resting B cells was significantly decreased in both post-RTX groups compared to HC ($p < 0.05$: 93 %, range 90.9-96.5 % vs 76.2 %, range 43.4-95.8 %, $p < 0.05$ when comparing HC and C-R patients, and 93 %, range 90.9-96.5 % vs 73 %, range 51.9-94.2 %, $p < 0.05$ when comparing HC and D-R patients. It was also reduced in IgD+resting memory B cells in D-R patients compared to HC (49.3 %, range 28.3-92.6 % vs 82.3 %, range 59.3-94.8 %, $p < 0.05$).

There were no significant differences in %TACI+ve expression between both post-RTX groups in any of the B-cell subpopulations studied.

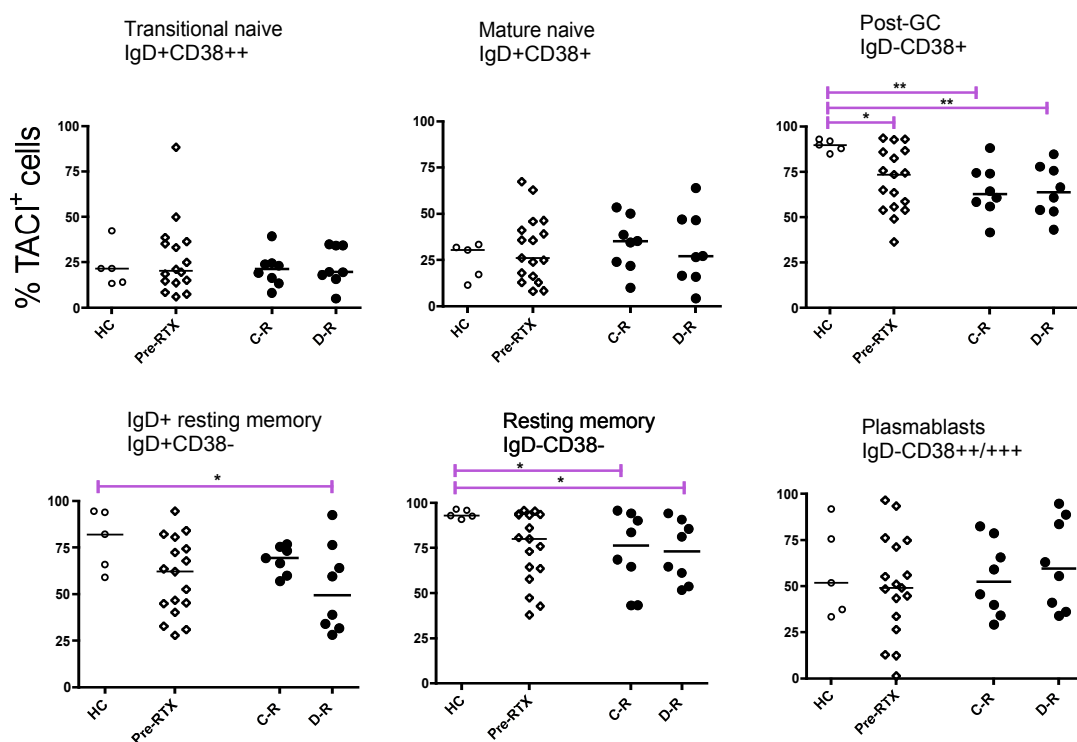


Figure 27: TACI+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. Differences between HC and RA patients were noted mainly in post-GC B cells showing a significant decrease in TACI % expression in all patient groups compared to HC (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

TACI expression (MFI) did not differ between patients and HC in any of the B-cell sub-populations except for the IgD+ memory resting B cell population, with a lower

TACI MFI expression in C-R patients compared to HC (37.6 MFI, range 21.9-98.8 vs 124 MFI, range 89.5-233, $p < 0.01$).

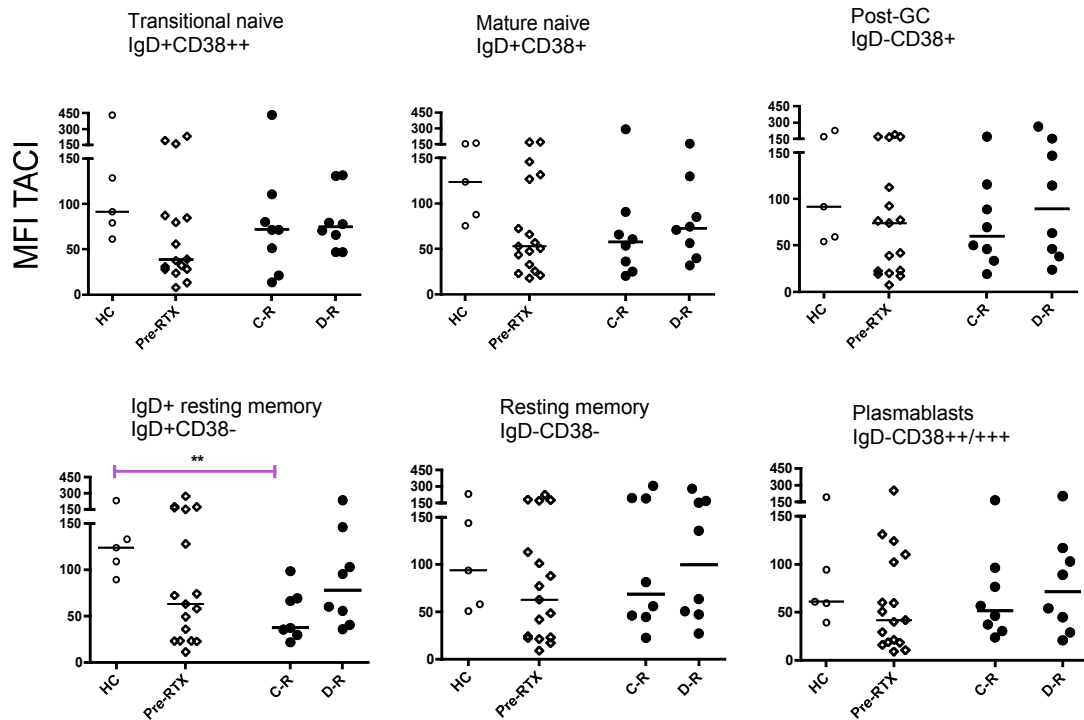


Figure 28: TACI MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. No significant differences were found in any of the B cell subpopulations studied except for a significant decrease in TACI MFI expression in IgD+resting memory B cells compared with HC (* $P < 0.05$).

The following figure shows a representative flow cytometry plot from a patient with a high % of memory B cell subpopulations previous to BCDT and at repopulation, therefore a higher % TACI+ve expression was noted.

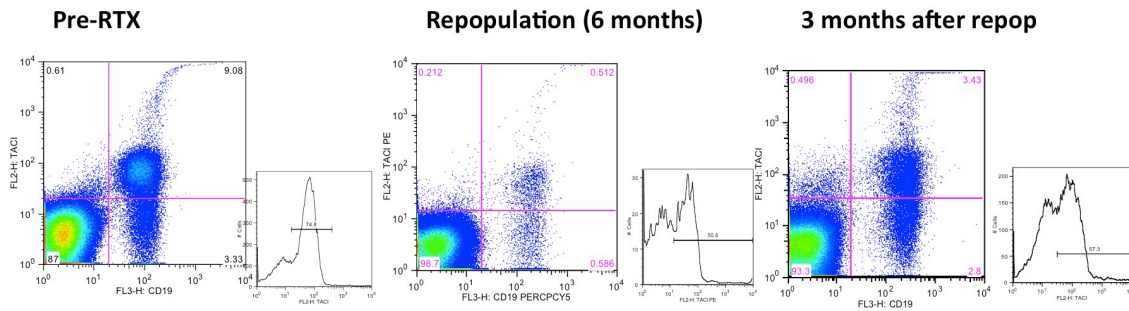


Figure 29: Flow cytometry plot of TACI expression in a patient pre and pos-RTX.

The graph shows TACI expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate, and the histogram showing relative expression of BAFF-R within the gated CD19+ population. First experiment was performed before RTX. Second graph represents repopulation, with a high % TACI+ve cells, since the patient had a high % of memory B cells at repopulation. Third graph represents TACI expression 3 months later.

c) BCMA expression

The figure shows that %BCMAve+ expression in different sub-populations, including plasmablasts, was similar among all groups, except for a significantly decreased expression in IgD- resting memory B cells in C-R patients compared to pre-RTX patients (11.7 %, range 0-21.4 % vs 26.7, range 4.9-39.1 %, $p < 0.01$) and in IgD+resting memory B cells in D-R patients compared to pre-RTX patients (22.6 %, range 1.6-38.2 % vs 35.3 %, range 11.5-55 %, $p < 0.05$). %BCMAve+ expression was higher in plasmablasts for both post-RTX groups undergoing relapse, however comparisons did not reach statistical significance.

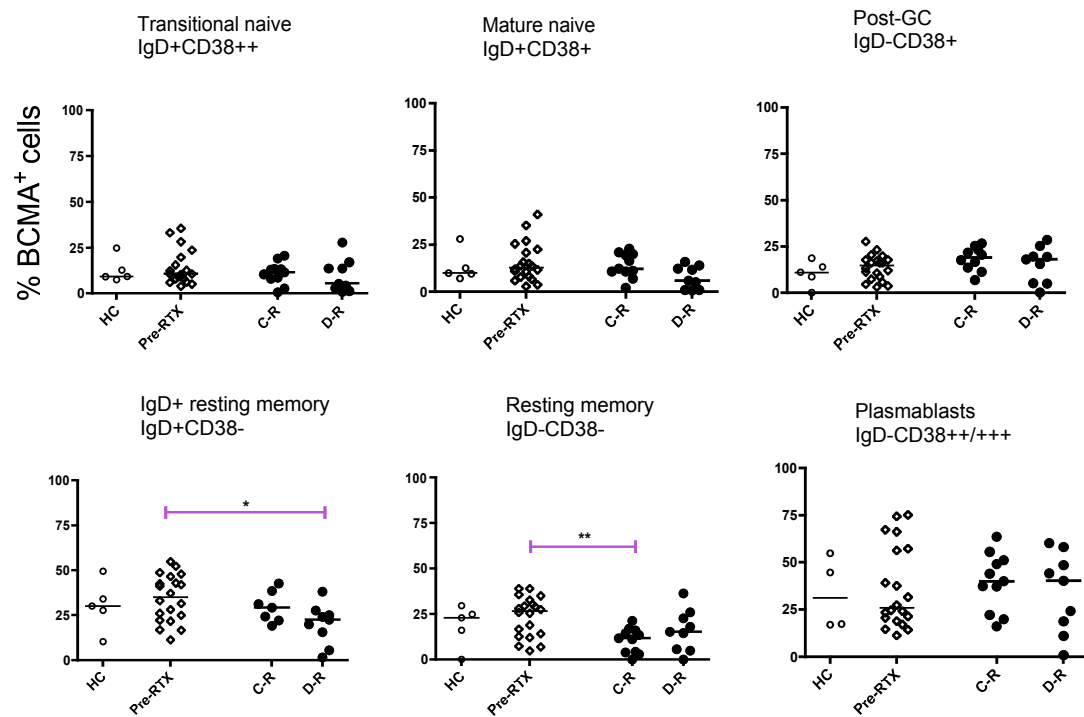


Figure 30: BCMA+ve % expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. No differences were observed except for a significantly decreased expression in IgD- resting memory B cells in C-R patients compared to pre-RTX patients and in IgD+resting memory B cells in D-R patients compared to pre-RTX patients (*P<0.05, **P<0.01).

As seen in the figure, BCMA MFI expression did not differ between patients except for the IgD-memory resting population, with a lower BCMA MFI expression in C-R patients compared to pre-RTX patients (23.2 MFI, range 16.2-21.5 vs 41.5 MFI, range 12.8-79.4, $p<0.01$).

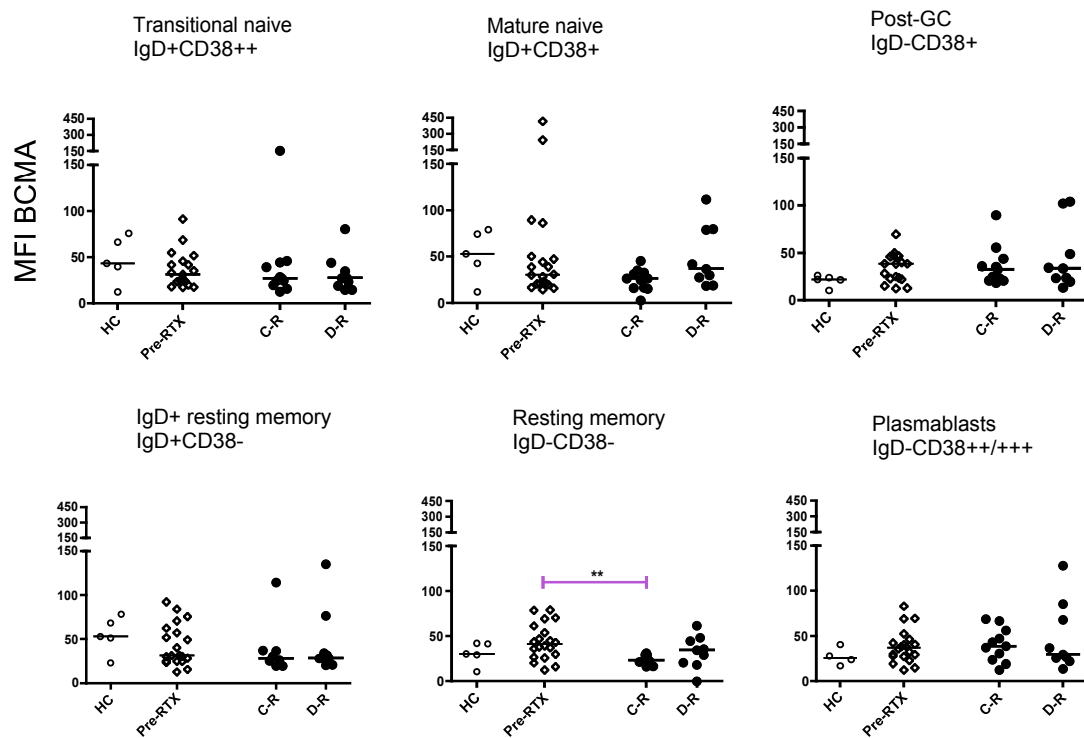


Figure 31: BCMA MFI expression in HC, pre-RTX patients and post-RTX relapsing patients. BCMA MFI expression did not differ between patients except for the IgD-memory resting population, with a lower BCMA MFI expression in C-R patients compared to pre-RTX patients (**P<0.01).

Next figure shows a representative plot a patient who remained in remission for 3 months after peripheral B cell repopulation.

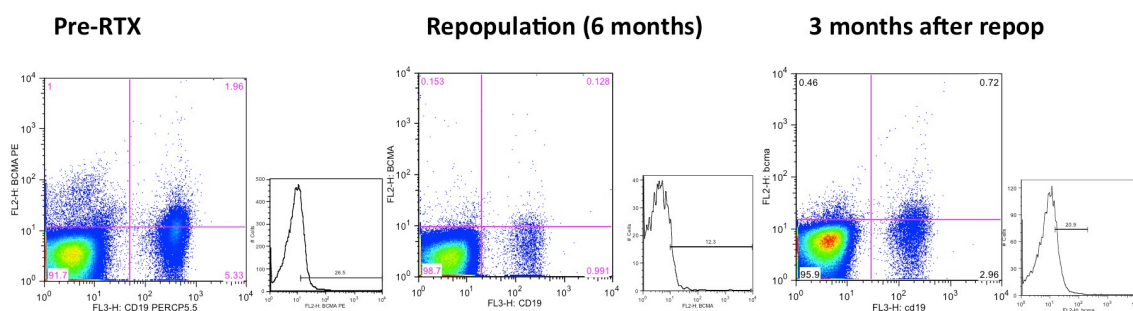


Figure 32: Flow cytometry plot of BCMA expression in a patient pre and pos-RTX. The graph shows BCMA expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate, and the histogram showing relative expression of BCMA within the gated CD19+ population. First experiment was performed before RTX. Second graph represents repopulation. Third graph represents BCMA expression 3 months later.

5. Is there a correlation between BBR expression and the time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse in post-RTX RA patients?

The figures show some significant correlations between BAFF-R expression and time from repopulation to relapse, in patients relapsing < 7 months after peripheral B cell repopulation. % BAFF-R+ve expression showed a significant correlation with time after repopulation in naïve transitional ($r^2=0.38$, $p<0.01$), naïve mature ($r^2=0.43$, $p<0.01$) and post-GC ($r^2=0.43$, $p<0.01$) B cells.

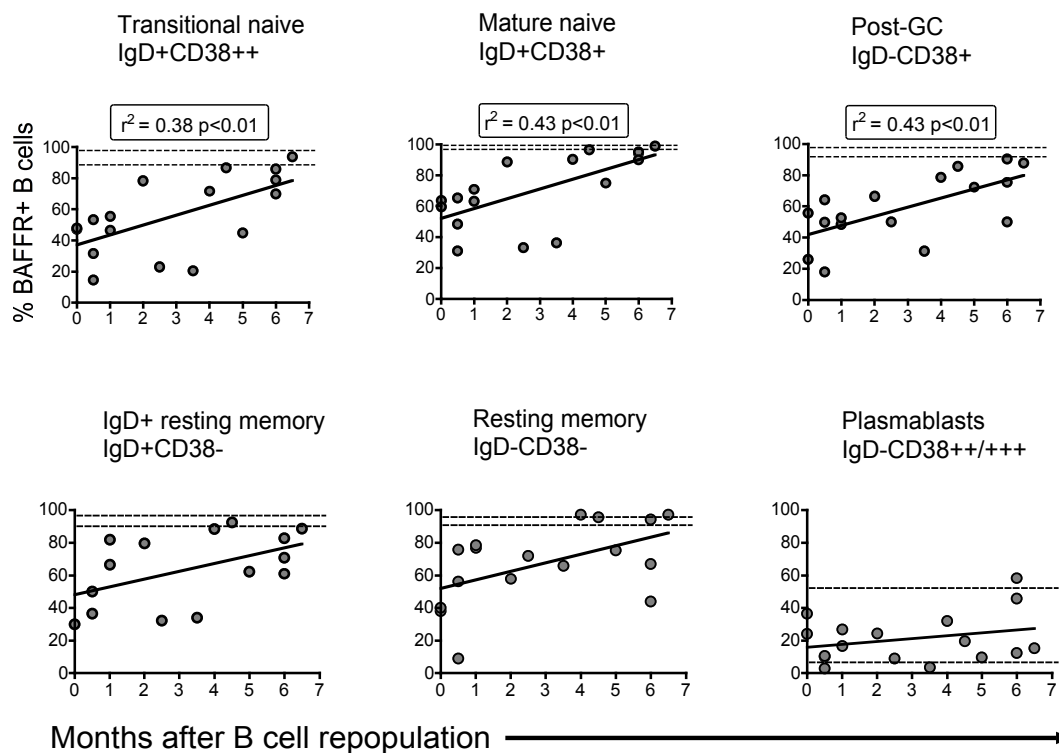


Figure 33: Correlation between BAFF-R+ve % expression and time between peripheral B cell repopulation and clinical relapse.

A significant direct correlation was found between the time (months) between repopulation and relapse and % BAFF-R+ve expression in naïve mature, naïve transitional and post-GC B cells. Dotted areas indicate the normal range of % BAFF-R+ve expression values given by respective B cell subpopulations in HC.

BAFFR MFI expression was significantly related to time after repopulation in naïve transitional B cells ($r^2=0.53$ $p<0.001$), post-GC ($r^2=0.33$ $p<0.05$), IgD-resting memory ($r^2=0.34$, $p<0.05$) and plasmablasts ($r^2=0.41$, $p<0.01$).

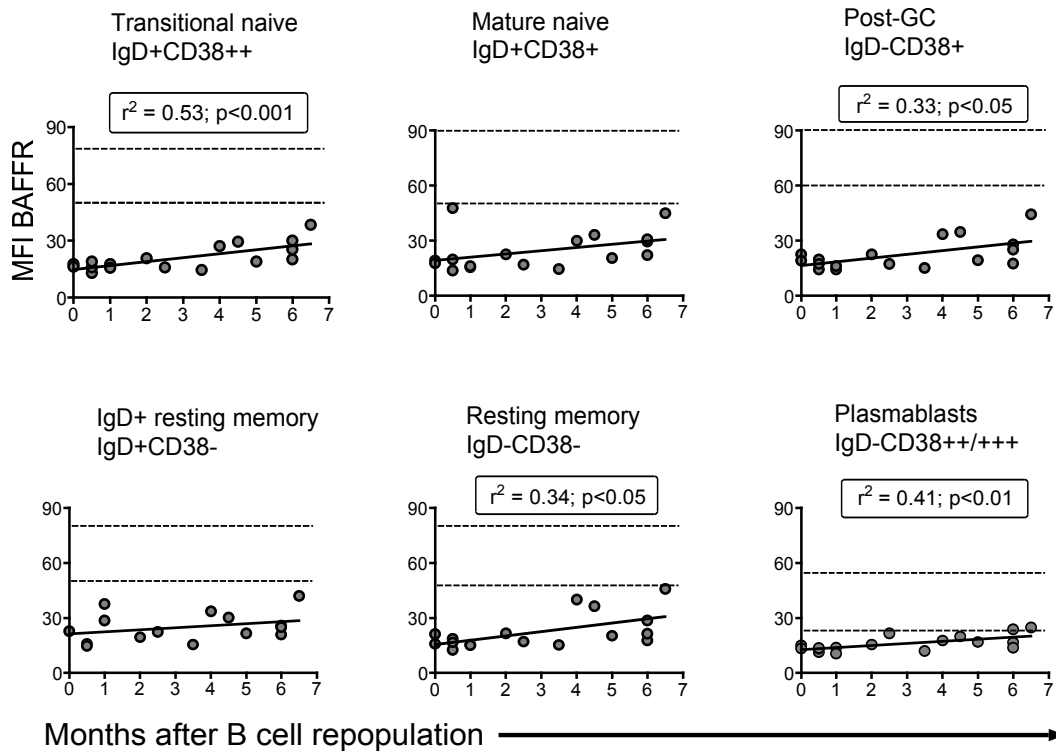


Figure 34: correlation between BAFF-R MFI expression and time from peripheral B cell repopulation to clinical relapse.

A significant correlation was found between the time (months) from repopulation to relapse and BAFF-R MFI expression in naïve transitional, post-GC, IgD-resting memory B cells and plasmablasts. Dotted areas indicate the normal range of BAFF-R MFI values given by respective B cell subpopulations in HC.

There was no correlation between TACI or BCMA % or MFI expression and time after repopulation in any of the B cell subsets studied (*data not shown*).

5. BAFF levels

Serum BAFF levels are shown in the next figure. Median BAFF levels in pre-RTX patients (1.43 ng/ml, range 0.84-2.39) were significantly raised ($p < 0.05$) compared to HC (1.1 ng/ml, range 0.89-1.24), although they remained within the normal range described for HC (< 2.45 ng/ml). BAFF levels in both post-RTX groups were significantly raised compared to HC and pre-RTX patients; median BAFF levels in C-R patients were 2.33 ng/ml (range 0.96-6.47), whereas in D-R patients they decreased to 1.72 ng/ml (range 1.14-4.35). There was no significant difference in BAFF levels between both post-RTX groups.

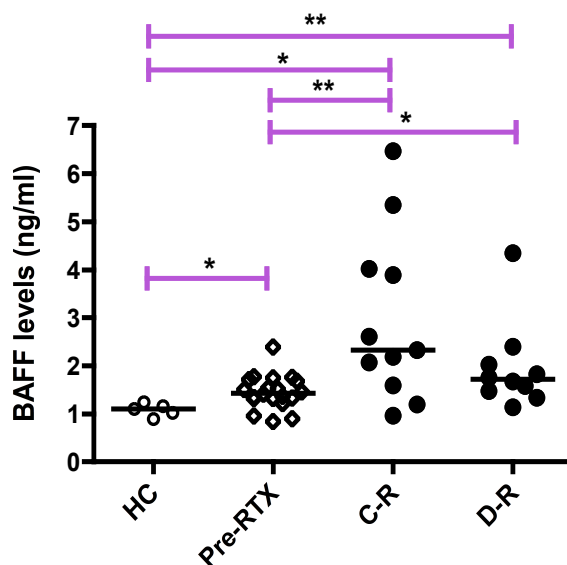


Figure 35: Serum BAFF levels in HC, pre-RTX patients, and post-RTX.

Serum BAFF levels increase after BCDT and decrease again at B cell repopulation. BAFF levels in both post-RTX groups were significantly raised compared to HC and pre-RTX patients. There was no significant difference in BAFF levels between both post-RTX groups ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

There was no significant correlation between serum BAFF levels and time from repopulation to relapse, or between serum BAFF levels and the number of RTX cycles

received. No correlations were found between serum BAFF levels and absolute numbers or percentage of the B-cell phenotypes studied (*data not shown*).

6. Do serum BAFF levels correlate with BBR expression?

A significant inverse correlation between BAFF levels and %BAFF-R+ expression was found in all B cell subsets except for plasmablasts ($p<0.0001$) for naïve transitional ($r^2=0.39$); naïve mature ($r^2=0.45$); post-GC ($r^2=0.49$) and IgD-resting memory ($r^2=0.42$).

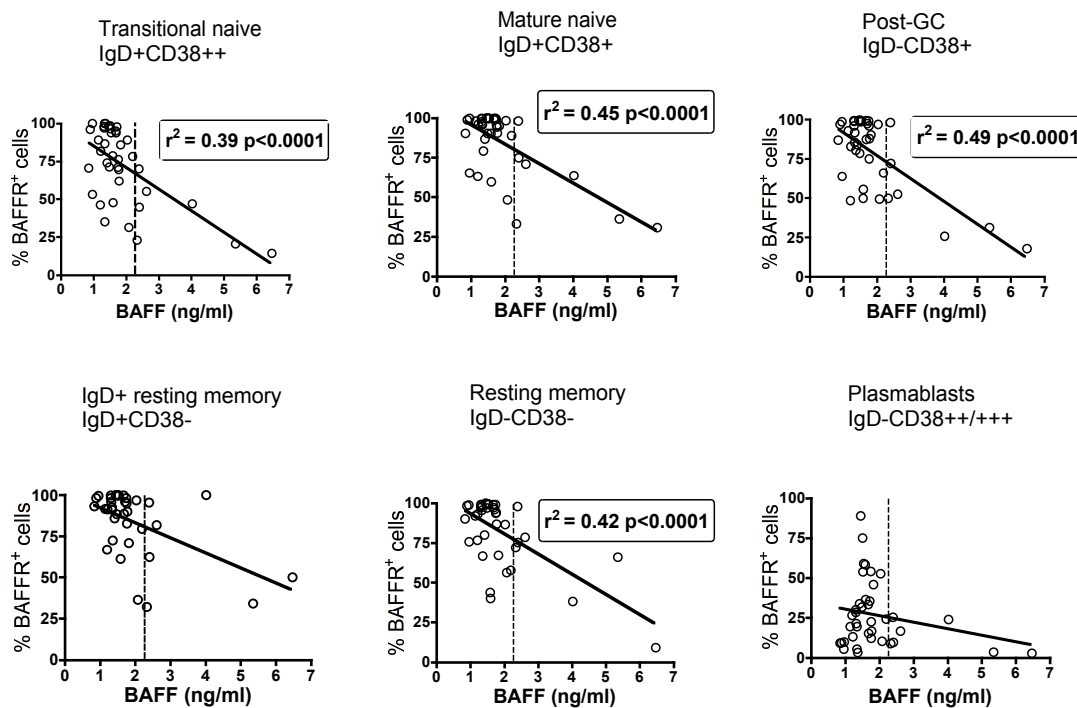


Figure 36: correlation between BAFF levels and BAFFR% +ve expression in RA patients.

Pre and post-RTX RA patients are included in this analysis. There is an inverse significant correlation for naïve B cells (transitional and mature) and for post-GC and IgD-resting memory B cells. Correlation was not significant for plasmablasts. The upper limit of normal for serum BAFF is represented as a vertical dashed line.

In post-RTX patients, the correlation described was kept in all B cell subsets except for plasmablasts and IgD⁺ resting memory B cells ($p<0.001$) for post-GC ($r^2=0.50$) and $p<0.01$ for naïve transitional and mature ($r^2=0.41$ for both) and IgD⁻ resting memory ($r^2=0.39$).

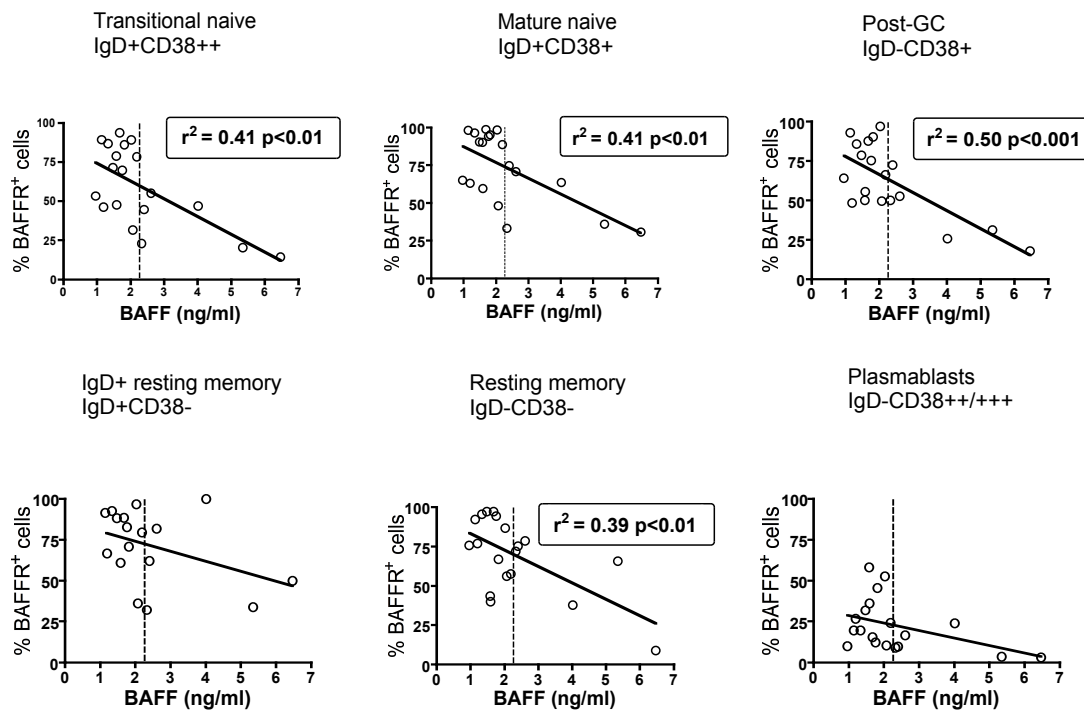


Figure 37: correlation between BAFF levels and BAFFR% +ve B cells in post-RTX patients. An inverse correlation is kept in both naïve B cell subsets, as well as post-GC and IgD⁻ resting memory B cells. The upper limit of normal for serum BAFF is represented as a vertical dashed line.

No significant correlation was found between BAFFR MFI expression and BAFF levels (*data not shown*).

TACI and BCMA studies did not show any significant correlations between BAFF levels and receptor expression in any of the groups studied (*data not shown*).

Expression of BAFFR on B cell subsets from TTP patients after BCDT

Clinical data are summarized in the tables 6 and 7. Mean age for TTP patients was 50 (median age 52, range 16-79). Mean age for the RA patients included in this study was 50 (median age 46, range 32-80).

Due to the difficulty of collecting samples from these patients before instituting treatment (often emergency) only 3 *de novo* presentations were collected and therefore these cases have been included in descriptive, but not in statistical, analyses. All 3 cases had received PEX and corticosteroids before blood sampling. Five TTP patients were studied at B-cell repopulation (5-10 months after RTX). In all 12 patients in remission, B-cell return was confirmed in samples taken between 10 and 68 months after RTX with all having CD19 counts within or even exceeding the normal range. There are no data of the time of peripheral B cell repopulation in the 12 TTP patients in remission.

Tabla 6: Demographics and laboratory data in TTP patients

	Age	Gender	Platelet count (x10 ⁹ /L)	ADAMTS13 (% normal value)	N° cycles	Months after RTX
ACUTE TTP						
1	65	M	16	26		
2	52	M	9	<5		
3	53	F	12	<5		
TTP AT REPOPULATION						
1*	65	M	215	96	1	10
4	64	M	259	40	1	7
5	26	M	299	102	2	8
6	79	F	204	>100	1	5
7	36	F	335	88	1	6
TTP IN REMISSION						
8	41	M	174	34	1	32
9	43	F	265	>100	1	44
10	53	F	288	75	1	68
11	16	F	277	37	1	18
12	72	M	475	91	1	14
13	52	F	289	>100	1	29
14	63	M	216	58	1	31
15	45	M	246	<5	1	51
16	44	M	191	115	1	33
17	42	F	274	109	1	54
18	29	F	544	99	1	10
19	57	F	279	16	1	60

* 1 y 1* are samples from the same patient

Tabla 7: Demographics and laboratory data in RA patients included in the comparative study with TTP

	Age	Gender	RHF	ACPA	Disease duration (years)	Months after RTX	Nº cycles
1	45	F	+	+	12	6	1
2	32	F	-	-	2	10	1
3	80	F	+	+	22	6	1
4	60	F	+	+	4	5	1
5	40	F	+	+	3	6	1
6	48	F	-	-	3	7	1

1. B cell phenotypes at B cell repopulation following rituximab

Next figure shows example plots of B cell phenotypes at B cell repopulation as defined by relative expression of IgD and CD27 for a patient with TTP and a patient with RA.

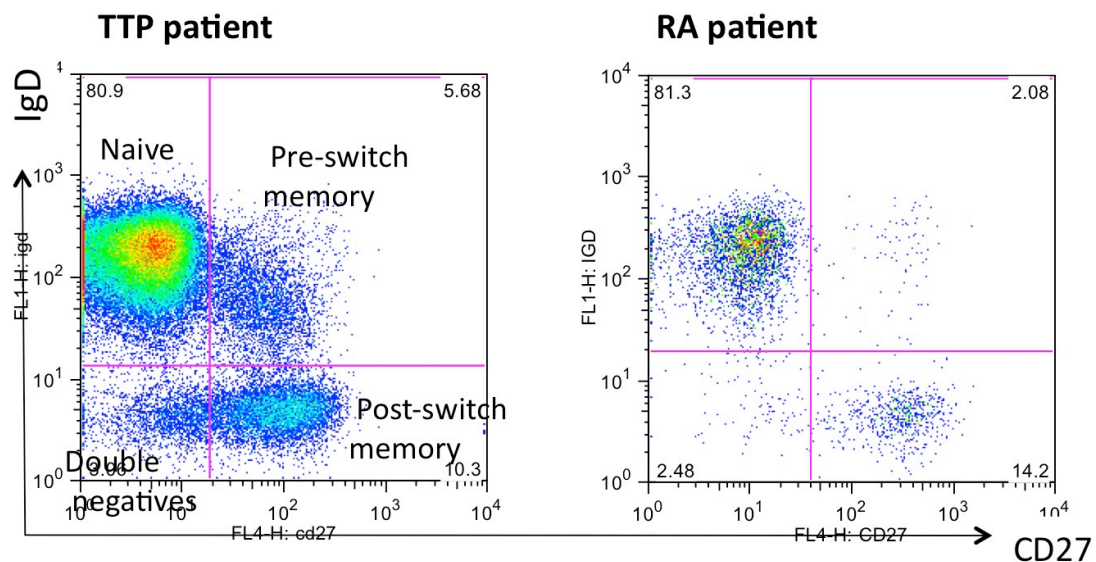


Figure 38: Representative plots of B cell phenotype at B cell return in a patient with TTP and one with RA, according to IgD/CD27 expression.

Next, % positive B cells and absolute numbers of B cells within each sub-population are shown for both diseases. In each case, the phenotype of repopulating B cells was predominantly that of naïve B cells. Percentages and absolute numbers of B cell sub-populations were similar, although IgD-CD27+ memory post-switch B cells in patients with TTP tended towards higher percentages compared to those with RA, but this did not reach statistical significance.

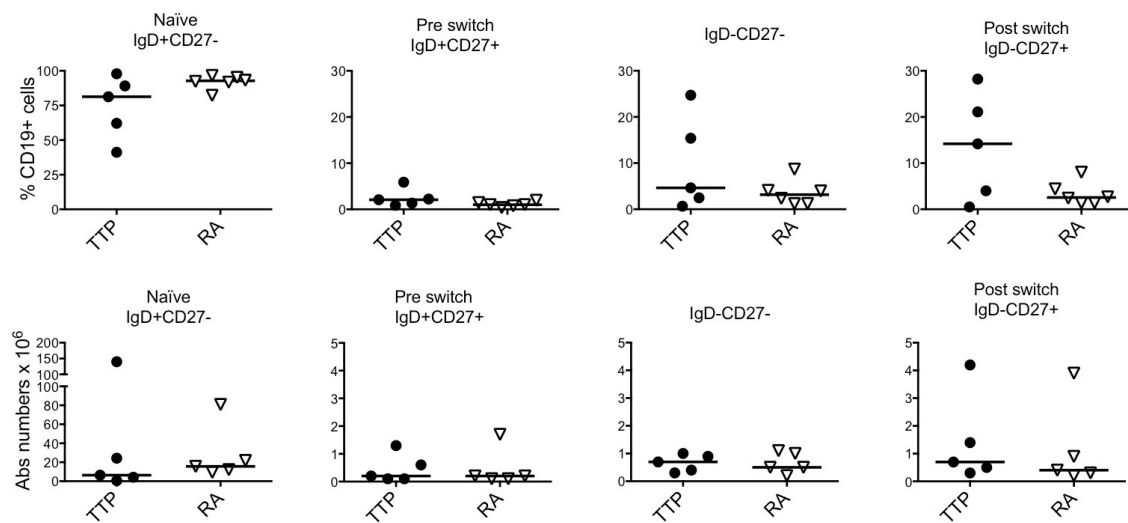


Figure 39: Comparison of B cell phenotype (IgD/CD27) between patients with RA and TTP at B cell return.

% positive B cells (CD19+) and absolute numbers of B cells within each sub-population are shown for each subpopulation for both diseases. No significant differences were found.

2. B cell phenotypes in TTP patients after B cell return

The following results compare median values. The figure shows the percentage and absolute value of B cell sub-populations within the CD19+ gate. The majority of B cells in patients in remission following RTX remained naïve (as at B cell return), retaining a significantly higher % compared with HC (91.8 %, range 82.8-96.8 % vs 62

%, range 50.2-78.6 %, $p<0.01$), corresponding with lower percentages of CD27+ pre- and post-switch B cells than HC (1.5 %, range 0.4-5.4 % vs 9.6 %, range 6.9-18.1 % and 1.7 %, range 0.45-9.9 % vs 18.2, range 11-35.9 % respectively, $p<0.05$ for both).

The absolute numbers within each sub-population increased significantly between B cell repopulation samples and remission samples: for naïve B cells: 6.4×10^6 cells, range 0.7 - 139.8×10^6 vs 174.9×10^6 , range 66.2 - 1098×10^6 , $p<0.01$; double negatives: 0.7×10^6 , range 0.3 - 1×10^6 vs 5.4×10^6 , range 0.7 - 89.9×10^6 , $p<0.01$; pre-switch memory: 0.2×10^6 , range 0.1 - 1.3×10^6 vs 4×10^6 , range 0.7 - 15.6×10^6 , $p<0.01$; the numbers of CD27+ post-switch B cells showed the smallest relative increase compared with values at B cell repopulation (0.7×10^6 , range 0.3 - 4.2×10^6 vs 3.9×10^6 , range 0.7 - 122.1×10^6 , $p<0.05$).

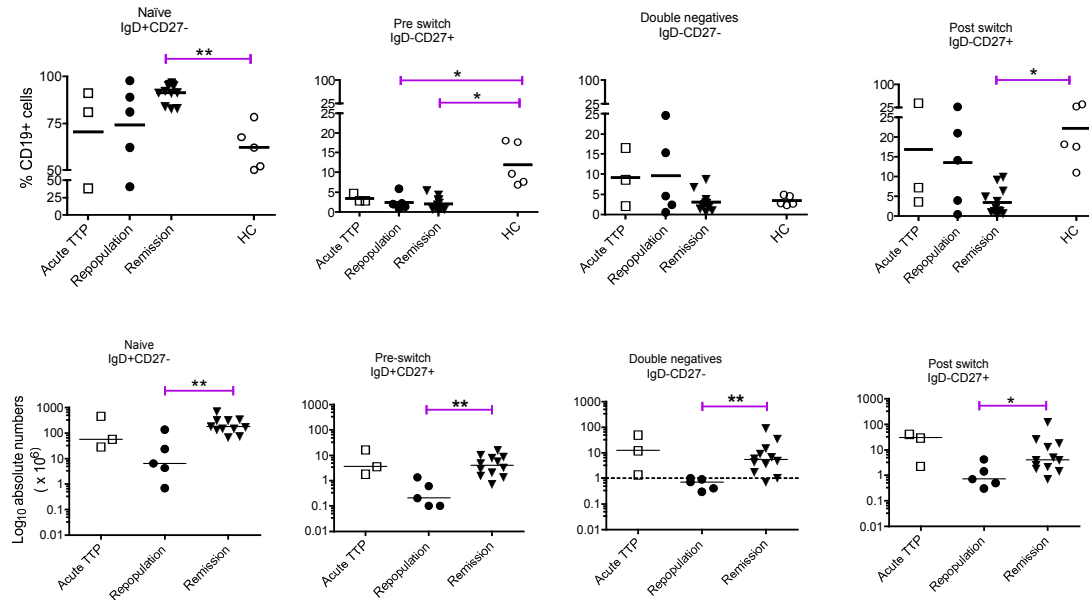


Figure 40: Evolution of B cell phenotype distribution in TTP patients throughout the course of RTX treatment.

Percentages and absolute numbers of each B cell phenotype are shown in this graph. The majority of B cells in patients in remission following RTX remained naïve. The absolute numbers within each sub-population increased significantly between B cell return and remission samples (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

3. Is there a correlation between B cell phenotypes and the time after RTX therapy was administered?

For these calculations, the time (months) after RTX had been administered has been used instead of time after repopulation, since exact repopulation time for TTP long-term remission patients was unknown, because CD19+ lymphocyte counts are not determined routinely in the hematology clinic.

Linear regression analysis confirmed a significant time-dependent decrease in percentage of naïve B cells over time, with an increase in percentages of post-switch and double negative B cells after RTX, but IgD+CD27+ pre-switch B cells showed very little recovery even after 68 months of follow-up. Only the double negative (IgD-CD27-) B cells reached values approximating HC (2.4 %, range 0.6-8.7 vs 2.8 %, range 2.3-4.9, albeit only within 2-3 years after RTX).

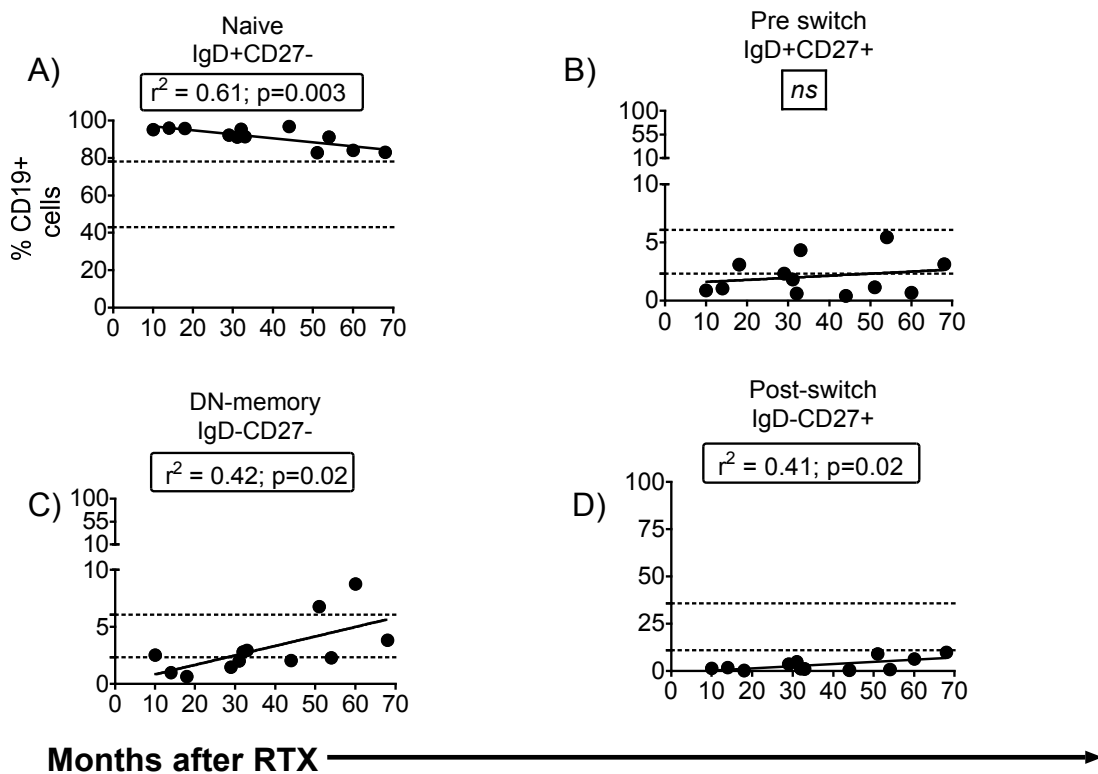


Figure 41: relationships between B cell subpopulations with time after rituximab (RTX). Percentages of each B cell subpopulation (CD19+) in TTP patients in remission for >10 months following treatment are plotted against time in months after RTX. A significant time-dependent decrease in percentage of naïve B cells is seen over time, with an increase in percentages of post-switch and double negative B cells (shown in the figure as DN-memory IgD-CD27-) after RTX. Dotted areas indicate the normal range of each B cell phenotype in HC.

4. BAFF-R expression at B cell repopulation

Next figure shows representative plots of BAFF-R expression on CD19+ B cells in a patient with TTP and one with RA at B cell repopulation, showing that BAFF-R expression is also reduced for patients with TTP. The % of CD19+B cells positive for BAFF-R in both diseases was approximately half that of HC.

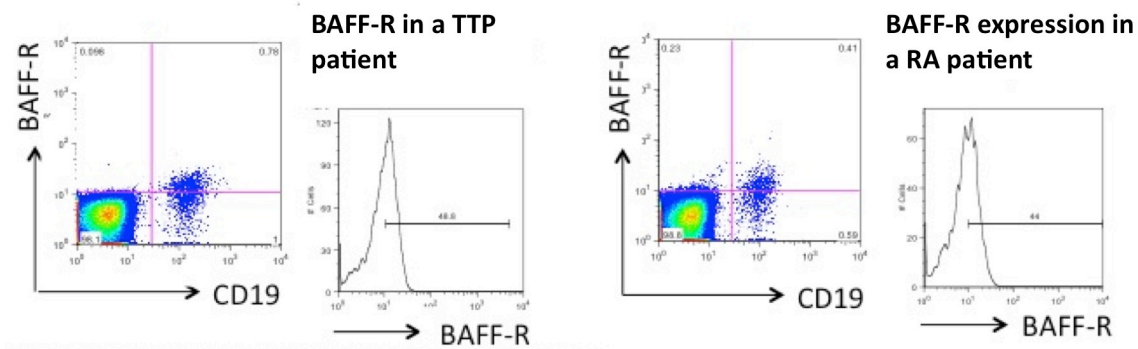


Figure 42: BAFF-R expression in TTP and RA patients at repopulation

Representative plots of BAFF-R expression on CD19+ B cells within the lymphocyte gate and histograms showing percentage CD19+ cells expressing BAFF-R in TTP and RA patients.

This was confirmed in the patient cohorts as a whole for both the percentage and the MFI of BAFF-R. There was no significant difference in %BAFF-R expression between TTP and RA patients. Compared with HC, %BAFF-R expression in B cell sub-populations in TTP and RA patients was significantly lower than HC (Mann Whitney Rank Sum): for naïve B cells: 99.8 %, range 99.3-99.9 in HC vs 47.9 %, range 30.8-68.9 %, $p < 0.01$ in RA and 44 %, range 18.9-85 %, $p < 0.05$ in TTP; double negatives: 98 %, range 96.2-99 % in HC vs 34.7 %, range 23.3-48.12 %, $p < 0.01$ in RA and 16.7 %, range 7.6-59.6 %, $p < 0.01$ in TTP; memory pre-switch: 99.7 %, range 99.5-99.8 % in HC vs 55 %, range 44.3-66.7 %, $p < 0.01$ in RA and 65.2 %, range 26.7-83.3 %, $p < 0.01$ in TTP; memory post-switch: 98.1 %, range 97.5-98.8 % in HC vs 55.75, range 35.9-65.8 %, $p < 0.01$ in RA and 51.1 %, range 10.7-74.1 %, $p < 0.05$ in TTP.

There were no significant differences in BAFF-R expression (MFI) between patient groups. BAFF-R MFI, was significantly lower than HC in all sub-populations of B cells: for naïve B cells: 60.4 MFI, range 54.8-84.2 in HC vs 17.4 MFI, range 13.6-24.2, $p < 0.01$ in RA and 15.2 MFI, range 12.7-23.1, $p < 0.01$ in TTP; double negatives: 60.7 MFI, range 58.4-80.4 in HC vs 16.1 MFI, range 11.3-34, $p < 0.01$ in RA and 15.5

MFI, range 12.7-31.1, $p < 0.01$ in TTP; memory pre-switch: 65.3 MFI, range 60.8-83.5 in HC vs 19.6 MFI, range 14.6-38, $p < 0.01$ in RA and 18 MFI, range 14.5-63.8, $p < 0.05$ in TTP: memory post-switch: 67.5 MFI, range 61.7-83.1 in HC vs 18.9 MFI, range 13.6-43, $p < 0.01$ in RA and 15.1 MFI, range 13.3-43, $p < 0.01$ in TTP.

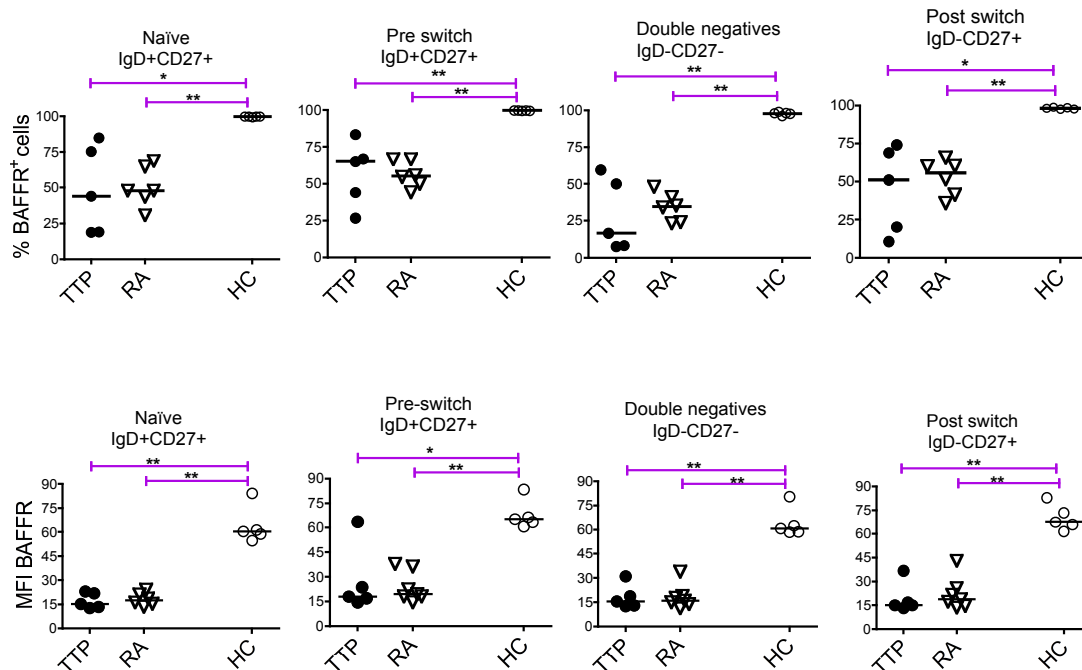


Figure 43: BAFF-R expression in TTP and RA patients at B cell return.

Percentage and MFI BAFF-R+ve expression for both patient groups and for HC in the 4 B-cell subpopulations as defined by IgD and CD27. There was no significant difference in %BAFF-R expression between TTP and RA patients. Compared with HC, %BAFF-R expression in B cell sub-populations in TTP and RA patients was significantly lower than HC (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5. BAFF-R expression in TTP patients after B cell repopulation

Although statistical comparison with acute TTP could not be applied, it appeared that pre-RTX, %BAFF-R+ B cells were similar to HC, was low in all B cell sub-populations at B cell repopulation as shown previously, but increasing towards those of HC in patients that remained in remission.

When comparing TTP patients in remission vs those at repopulation, %BAFF-R+ cells were significantly increased in all B cell subpopulations: naïve B cells: 94.7 %, range 79.2-98.8 % vs 44 %, range 18.9-85 %, $p<0.05$; double negatives: 89.8 %, range 70.9-98.4 % vs 16.7 %, range 7.6-59.6 %, $p<0.01$; memory pre-switch: 89 %, range 51.1-98.5 % vs 65.2 %, range 26.7-83.3 %, $p<0.05$; memory post-switch: 87 %, range 67.1-97.7 % vs 51.1 %, range 10.7-74.1 %, $p<0.05$.

When comparing TTP patients in remission with HC, %BAFF-R+ cells remained significantly decreased: naïve B cells: 94.7 %, range 79.2-98.8 % vs 98.8 %, range 96.8-99.9 %, $p<0.01$; double negatives: 89.8 %, range 70.9-98.4 % vs 95 %, range 83.6-98.4 %, $p<0.01$; memory pre-switch: 89 %, range 51.1-98.5 % vs 98.8 %, range 96.3-99.8 %, $p<0.01$; memory post-switch: 87 %, range 67.1-97.7 % vs 97.7 %, range 95.5-98.8 %, $p<0.01$.

Although not included in the statistical analysis, BAFF-R expression (MFI) on B cells from acutely presenting TTP patients appeared lower than in HC. BAFF-R MFI expression increased significantly in patients in remission compared with that of cells at B cell repopulation, but remained significantly lower than in HC.

When comparing TTP patients in remission vs those at repopulation, BAFF-R MFI expression was significantly increased in all B cell subpopulations except for memory pre-switch: naïve B cells: 35.2 MFI, range 15.2-63.5 vs 15.2 MFI, range 12.7-23.1, $p<0.01$; double negatives: 35.1 MFI, range 19.7-55.4 vs 15.5 MFI, range 12.7-31.1, $p<0.01$; memory post-switch: 39 MFI, range 25.8-52.2 vs 15.1 MFI, range 13.3-36.7, $p<0.01$.

However, BAFF-R MFI expression remained significantly decreased in all B cell subpopulations in TTP patients in remission compared with HC: naïve B cells: 35.2 MFI, range 15.2-63.5 vs 72.7 MFI, range 54.8-217, $p<0.01$; double negatives: 35.1 MFI, range 19.7-55.4 vs 69.4 MFI, range 58.4-181, $p<0.01$; memory pre-switch: 35.4 MFI, range 16.7-57.2 vs 74.9 MFI, range 60.8-216, $p<0.01$; memory post-switch: 39 MFI, range 25.8-52.2 vs 78.1 MFI, range 61.7-229, $p<0.01$.

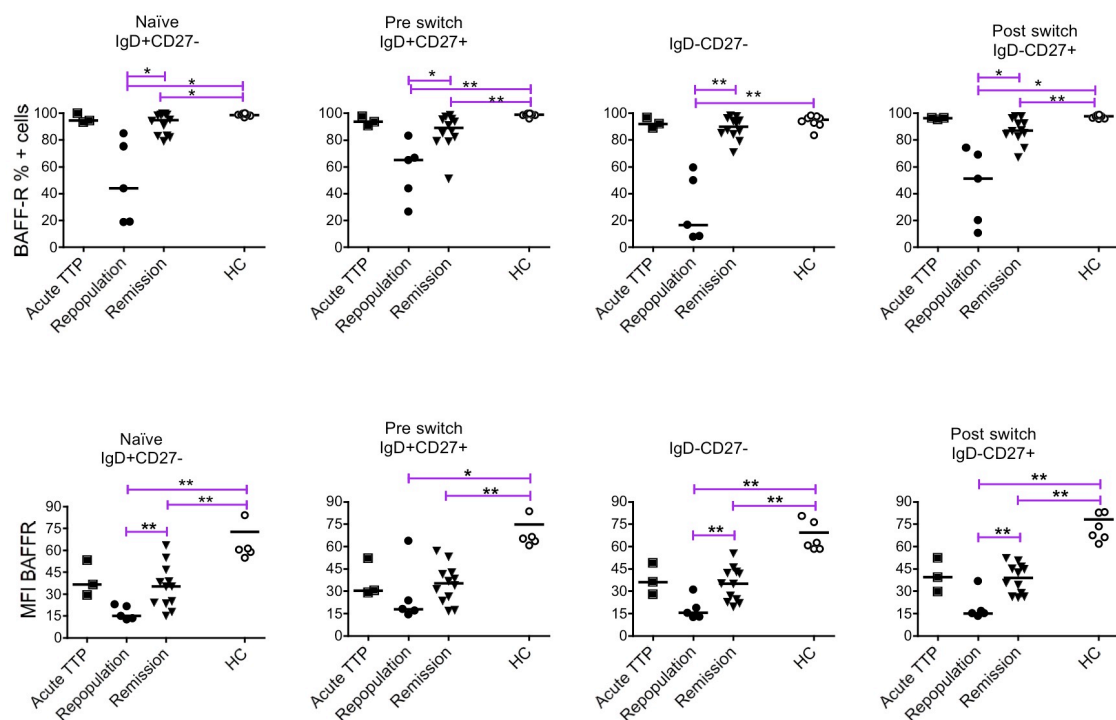


Figure 44: BAFF-R +ve % B cells on B cell subpopulations in TTP patients before and after RTX.

Percentage and MFI BAFF-R+ve expression in each sub-population as defined by IgD/CD27 are shown for patient cohorts pre-RTX, at B cell return and in patients in remission and compared with levels in HC. %BAFF-R+ B cells was low in all B cell sub-populations at B cell repopulation but increasing towards those of HC in patients that remained in remission (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

6. Is there a correlation between BAFFR expression and the time after RTX therapy was administered?

Linear regression confirmed that there was a gradual time-related rise in BAFF-R (% and MFI) expression, particularly in naïve and pre-switch populations. BAFFR +ve % and MFI expression increases with time, with a significant direct correlation for BAFFR +ve % memory pre ($r^2 = 0.41$, $p < 0.05$) and post-switch B cells *switch* ($r^2 = 0.45$, $p < 0.05$), and a significant direct correlation for BAFFR +ve MFI expression in all B cell subsets, as shown in the figure. As seen in the previous data, BAFF-R+ B-cells (% expression) increased to almost normal levels in TTP patients during remission following B-cell return. However, the numbers of BAFF-R per cell (MFI) remained well below the normal limits for healthy individuals for many months after RTX.

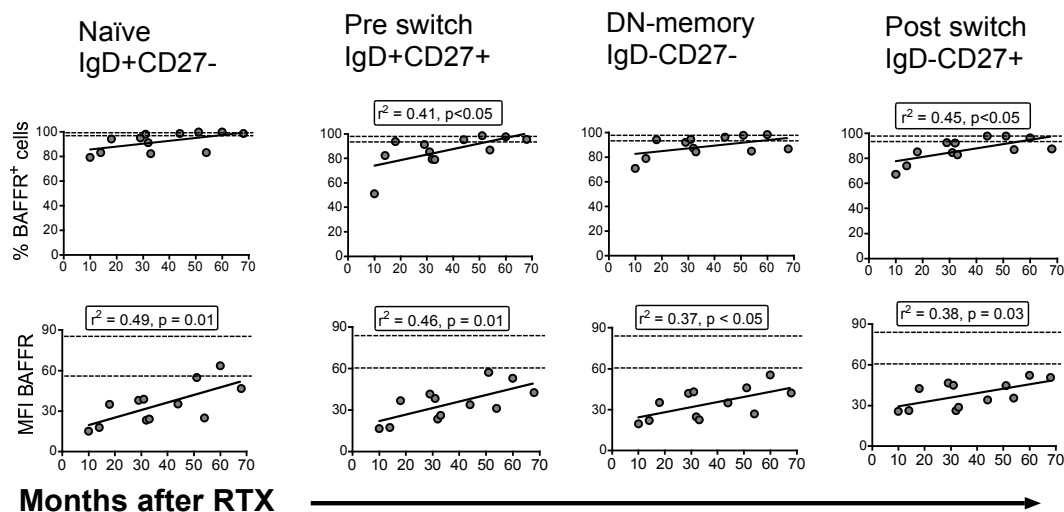


Figure 45: Relationships between BAFF-R expression (% and MFI) and time after B cell repopulation

Percentages and MFI of BAFF-R+ve expression in TTP patients in remission after B cell repopulation are shown. BAFFR +ve % and MFI expression increases with time, with a significant direct correlation for BAFFR +ve % memory pre and post-switch B cells, and a significant direct correlation for BAFFR +ve MFI expression in all B cell subsets. Dashed lines shows limits for levels of BAFF-R % MFI in each B cell population in HC.

7. BAFF levels

In the 3 Acute TTP patients, BAFF levels were within normal limits ($<1.9\text{ ng/ml}$), but may have been influenced by PEX/corticosteroids given before sampling. Following RTX, BAFF levels were significantly raised at B cell repopulation in patients with TTP compared to HC (3.1 ng/ml , range $1.6\text{--}4.4$ vs 1 ng/ml , range $0.9\text{--}1$, $p < 0.05$). During remission following B cell return, the median BAFF levels in TTP patients had significantly decreased compared with that at B cell return (1.49 ng/ml ; range $0.9\text{--}3.2$ vs 3.1 ng/ml , range $1.6\text{--}4.4$, $p < 0.05$), with no significant difference compared with HC.

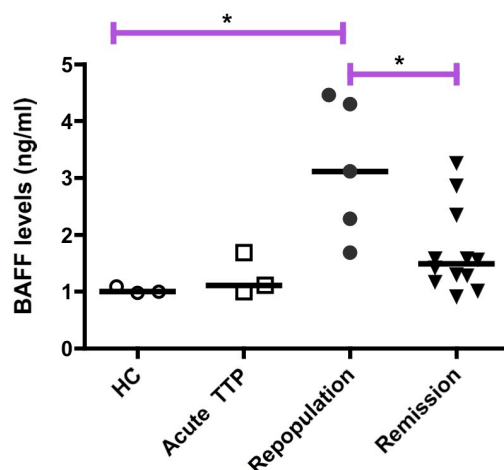


Figure 46: Serum BAFF levels in HC and TTP groups before and after RTX.

Following RTX, BAFF levels were significantly raised at B cell repopulation in patients with TTP compared to HC ($p < 0.05$). During remission following B cell return, the median BAFF levels in TTP patients had significantly decreased compared with that at B cell return ($*p < 0.05$).

A significant negative correlation ($r^2 = 0.55$, $p < 0.01$) was found between serum BAFF levels and time following RTX therapy, with the highest BAFF levels found in samples taken closest to the therapy infusion.

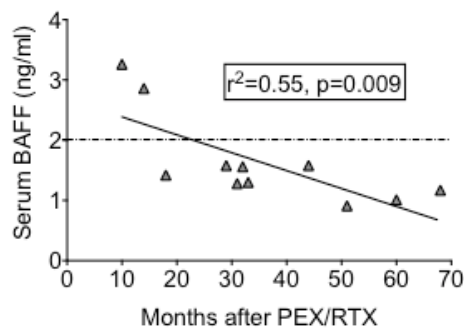


Figure 47: Relationship between serum BAFF levels with time after RTX in patients remaining in long-term remission.

A negative correlation was found between serum BAFF levels and time following RTX therapy. Dashed lines show upper limit of normal range for serum BAFF.

Serum BAFF levels were also plotted against numbers of CD19+ B-cells during remission; no correlation was found but notably most patients' B-cell counts had shown a robust recovery after RTX to well within the normal range (*data not shown*).

8. Do serum BAFF levels correlate with BAFF-R expression?

A statistically significant inverse correlation between BAFF levels and BAFF-R expression (% and MFI) in remission TTP patients was found over all B-cell sub-populations.

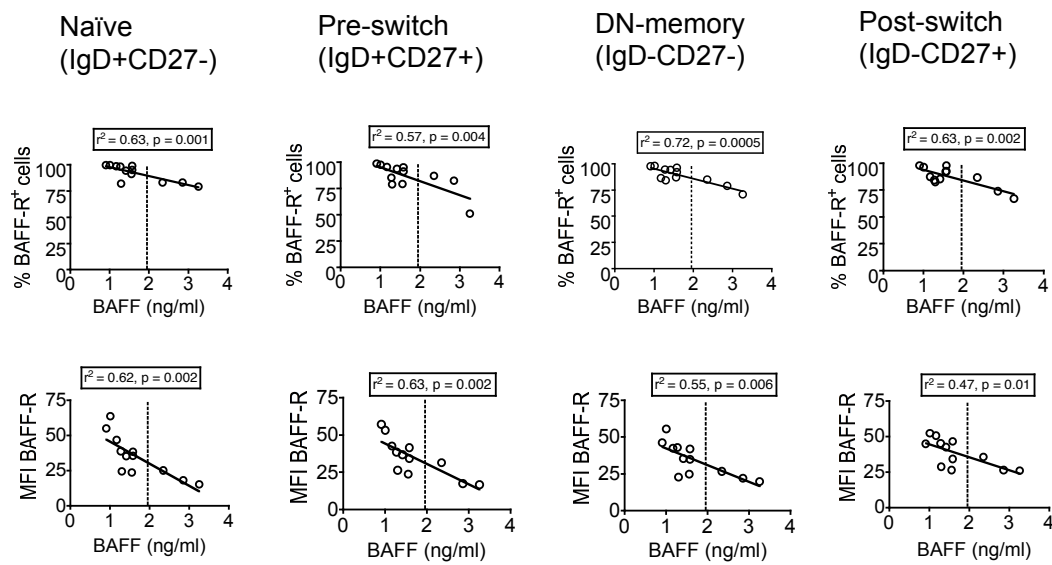


Figure 48: Relationships between serum BAFF levels after RTX with BAFF-R expression.

BAFFR expression (% and MFI) are plotted against serum BAFF levels in patients in remission, finding a statistically significant inverse correlation over all B-cell sub-populations. The solid lines depict the calculated linear regression and correlation statistics. Vertical lines indicate upper limit of normal range for serum BAFF.

DISCUSSION

Patterns of relapse in the RA cohort treated with RTX at UCL

B cell depletion therapy based on RTX has proved to be an effective and safe therapy, with available long-term data of its use for over 10 years [44, 47-49, 76]. Long-term clinical observations have led to the confirmation of the two patterns of relapse after RTX [36, 74], although in this study, frequencies of both patterns differ from the initial observations. The C-R pattern is more frequent than the D-R pattern (70% vs 30%).

Time from the treatment to peripheral B cell repopulation and the pattern of relapse for every individual patient is important in daily clinical practice, since it can help determine the duration of each RTX cycle, as described at the UCL patient cohort, although there is a great variability among patients. Two main advantages can be identified from that fact; first, the clinician can avoid unnecessary RTX cycles, reducing the cost of the therapy. A recent cost-effective study pointed out that RTX retreatment at clinical relapse was found to be at least equivalent to the more intensive regimen proposed [187]. The second advantage focuses on the reduction of side effects. Repeated RTX cycles can produce hypogammaglobulinaemia [44, 65], which clearly increases with repeated cycles particularly for IgM and in a lower frequency for IgG [66], especially in patients treated with a 6 month fixed retreatment schedule [78]. Hypogammaglobulinaemia may lead to an increased frequency of infections in predisposed patients [67].

As seen in daily clinical practice at UCL, most patients keep the same pattern of relapse over the following cycles, which is an advantage for planning pre-emptive future RTX cycles. Some patients even show a longer duration of remission after several cycles. Another important fact is that patients with persistent disease activity after 1-2 cycles of treatment achieve a better response after several RTX cycles [55], possibly because subsequent RTX cycles will have achieved a more extensive B cell depletion in solid tissues.

Retreatment strategies at UCL are based on the specialist's experience from previous clinical observations [63, 188]. At their specialized clinic, CD19+ lymphocyte count is monitored accurately; for clinical purposes, it should be determined prior to RTX, 3 months after the therapy to confirm depletion, and then every 2-3 months until peripheral B cell repopulation is confirmed. Patients should be followed up very closely after their first cycle, and be retreated at first signs of relapse. Following cycles would be then planned according to the previous cycle duration [75]. Such strategy has been applied over the last years, with patients being usually retreated one month before the calculated time of relapse based on the previous cycle, avoiding relapse in most cases.

Data from the literature for retreatment strategies are very limited. Most studies follow a treat-to-target strategy, as recommended in the last consensus statement for the use of RTX in RA, considering retreatment at 24 weeks in patients who do not reach remission or show low disease activity [49]. Emery's study also favoured a treat-to-target strategy by targeting a DAS-28 remission, reducing the frequency of RA flares with the same rates of infections and serious adverse events [189]. The Belgian MIRA registry, following up 401 patients, points out that patients should be retreated before

they show an obvious flare-up, and recommend systematic retreatment of patients with a remaining disease activity of DAS28 > 3,2 [190].

Other studies however, reflect other retreatment strategies. The Swiss study suggests retreating responders with remaining residual disease activity at 6 months, to maintain and improve response, whereas in optimal responders they “wait and see”, retreating at any sign of returning disease activity [191]. The strategy applied at UCL follows that algorithm, but adding the pre-emptive retreatment strategy according to the previous cycle duration, in order to avoid future flare-ups [75]. A recent German study assessed the usefulness of Power Doppler Ultrasound for detecting inflammatory changes and therefore predicting the necessity of RTX re-therapy. They concluded that Power Doppler Ultrasound was able to detect the onset of disease activity before worsening of symptoms; therefore it can be a very powerful instrument for evaluating disease activity and making earlier therapy decisions [192].

B cell subpopulations in RA and TTP patients after RTX

In the RA experiment, the high percentage of transitional B-cells seen in C-R patients reflects the initial repopulation process, characterized by these initial immature B cells, which rapidly turn into naïve mature B cells [36, 37]. C-R patients will tend to relapse with higher % and absolute numbers of naïve transitional B cells, whereas D-R patients will have higher % and absolute values of naïve mature B cells.

Plasmablast % and absolute number was increased at repopulation, but did not reach statistical significance. That finding suggests that in C-R patients there is a rapid

differentiation of naïve B-cells to a plasmablast phenotype, which would trigger relapse. It has been suggested that after RTX, the composition of the pool of returning B cells may predict subsequent timing of relapse in patients with RA [57]. A proportion of the transitional naïve B-cell population would already be committed to differentiation to ISC in those patients. Rises in autoantibody levels associated with relapse following RTX [62] reinforce this possibility. The memory B-cell pools are low at repopulation, and tend to increase after several months, but persist very low in D-R patients.

In the TTP and RA repopulation study, there were no significant differences in B cell subpopulations at B cell return after RTX between RA and TTP patients, although there was a trend for a higher % of memory post-switch B cells in patients with TTP, despite being in clinical remission. Following the return of predominantly naïve B cells to the periphery after RTX, levels of pre-switched and post-switched memory B cells in TTP patients remained significantly lower than in healthy controls, with only a gradual rise even after 5_{1/2} years of follow-up. Even then, the memory B cell compartments failed to reach levels seen in HC.

Following B cell depletion therapy, B-cells repopulate primarily from naïve B-cells, with regeneration of the memory B-cell pool often delayed [36, 193]. One of the first observations with respect to B-cell kinetics after B-cell depleting therapy in autoimmune diseases was that relapse occurred at the time or after B-cell return, and that B-cell return mirrored ontogeny [36, 37]. The relative number of returning B-cells however, has not been a reliable indicator of the likelihood of return of symptoms either in patients with RA or in TTP [63, 127].

Poor memory B-cell reconstitution may reflect long term indirect effects of RTX on B-cells, described both after organ transplantation [34] and in other autoimmune diseases [36, 39]. The reasons are not fully understood but it has been suggested that productive germinal center reactions may be disturbed due to microenvironmental changes caused by the absence of, or reduction in, mature B-cells [38, 39, 194].

To date, all patients with RA who respond to RTX seem to eventually relapse, although significant reduction in symptoms can sometimes last for many months or even a few years. In contrast, the majority of patients with TTP treated with RTX can go into long-term remission (years or even for life) after one single cycle of RTX. Studying TTP patients in remission after one cycle of RTX has been very useful to follow up long-term RTX effects in B cell subpopulations. RA patients usually need subsequent RTX cycles, therefore samples from RA patients in long-term remission after RTX are not usually available.

Results also suggest that slow memory B-cell reconstitution in TTP patients is linked with extended periods of remission. As relapse is most strongly associated with return or rises in autoantibodies to ADAMTS13, the selection and differentiation of specifically autoreactive B-cell clones from naïve and/or memory B-cell populations must also play a key role. If derived from newly generated naïve B-cells, the production of anti-ADAMTS13 may additionally involve a change in affinity through clonal expansion and somatic hypermutation. The chances of sufficient autoreactive clones being selected, expanded and differentiating into immunoglobulin secreting cells may thus be low after RTX in TTP patients.

However, T-cell help for autoantibody producing clones may be relatively abundant in RA compared with TTP due to the potentially promiscuous nature of B-cells with specificity for Fc of IgG or citrullinated proteins [42, 72, 195]. There would therefore be many more chances for potentially pathogenic clones to be expanded in RA.

BAFFR expression

BAFF-R is expressed on most transitional B-cells on exit from the BM [160], and increases to maximal expression (>99%) on reaching the mature naïve stage in human peripheral blood. BAFF-R expression on B cell subsets before BCDT was similar in RA and TTP patients naïve for RTX, as well as HC, as previously described by analysing 15 active RA patients pre-RTX [71] and confirmed in a larger study which analysed 208 pre-RTX RA patients [57].

De la Torre et al had previously reported significantly lower expression (MFI) of BAFF-R and also %B-cells expressing BAFF-R, on naïve and memory B-cells, as defined on the basis of IgD/CD27, in relapsing patients with RA, after a period of major clinical improvement induced with RTX. BAFF-R expression was lower in C-R patients, therefore their mechanism of relapse probably involves early autoreactive B cells that overcome consequences of lower levels of BAFF-R signalling [71].

At the current study, the three BBRs have been analysed, and the plasmablast population has been included in the phenotype study. Although both % and MFI expression for each BBR have been analysed, the study has focused on analyzing %

BBR expression because there is less variability in results compared to MFI calculations, which change depending on the experimental conditions and laser fluctuations depending on the day the sample was analysed.

In post-RTX RA patients, the proportion of naïve transitional B-cells expressing BAFF-R was significantly reduced, particularly in C-R. In the RA-TTP comparative study, BAFF-R expression at repopulation (% and MFI) was notably decreased in both diseases. Although BAFF-R expression increased gradually with time after RTX in TTP patients, it failed to reach levels comparable with pre-RTX patients or with HC, even after more than 5 years in some patients.

These results are similar to findings in ontogeny where naïve B cells (often CD5+, which are very early B cells) express less BAFF-R compared with adult B cells [136]. In patients with BAFF-R deficiency, who form a subset of patients with late onset CVID, there are severely reduced numbers of all mature B cell subsets, but increased proportions of transitional B cells [157], reflecting the need for naïve B cells to signal through BAFF/BAFF-R and tonic BCR signaling for survival [132]. A partial reduction in BAFF-R expression on naïve B cells as seen after RTX may possibly decrease the level of expression of anti-apoptotic markers maintained through this receptor, therefore reducing the proportion of cells able to mature further.

Chronically raised serum BAFF has been suggested to exert a negative feedback on BAFF-R expression, perhaps due to internalisation or shedding, independently of exposure to B-cell agonists [137, 148]. Alternatively, low BAFF-R expression may be a

repopulation phenomenon where newborn B cells physiologically express less BAFFR, as shown in preterm neonates [136].

Some RA patients will however relapse in spite of their low BAFF-R expression, suggesting they would override the disadvantages of low BAFF-R expression/signaling, following a different relapsing mechanism [71]. D-R patients probably need a critical mass of autoreactive B cells and would have time to “normalize” their BBR expression, so their mechanism of relapse would follow a more “normal” pathway [182]. In these patients, maturation into the autoreactive memory B-cell or ISC pools proceeds for variable periods of time until a critical point is reached when relapse is precipitated, needing an ‘accumulation’ of naïve and memory B-cells to trigger relapse.

BCMA expression

The role of BCMA in B-cell function remains confusing; it is predominantly expressed in the Golgi apparatus [176], whereas cell surface expression appears to be low in normal human B cells. It is mainly expressed on plasma cells and is thought to be critical in maintaining the survival of BM long lived plasma cells [177]. It is acquired in mature B-cells accompanied by loss of BAFFR expression, coincident with differentiation into ISC [138, 196]. The role of this receptor acquires importance in MM malignant B cells, where its surface expression is present and can contribute to the growth and survival of malignant plasma cells [178]. BCMA expression has been found to be increased in lupus cells compared to HC [179-181], especially in plasmablasts and

memory B cells, but also in transitional B cells, possibly reflecting a greater degree of B-cell activation [179].

In this study, BCMA expression (% and MFI) was similar between HC and all RA groups with the exception of slight increases in the memory resting populations for post-RTX patients. Both post-RTX groups showed a slight increase in BCMA % expression in plasmablasts, however not reaching statistical significance. That would support the hypothesis of plasmablast activation promoting relapse in both patient groups.

TACI expression

The role of TACI in B-cell responses is complex with contrasting functional outcomes depending on context and conditions. TACI preferentially binds oligomerised substrate-bound complexes of BAFF and APRIL [197] and, in co-operation with signalling through TLR (largely through the ERK/JNK pathway), is thought to be involved in CD40-independent IgM production [167]. Lack of expression of TACI results in reduction in serum IgA and IgG levels, but increased B-cell numbers, attributed to the accompanying loss of inhibitory signals to BAFF-R and CD40 mediated responses seen with normal TACI expression. Co-ligation of TACI and proteoglycans is thought to be essential for class switch recombination [172], with defects in TACI expression associated with some forms of common variable and IgA deficiency in man [198]. Using agonistic antibodies, Sakurai and colleagues showed that stimulation of B-cells with anti-BAFF-R plus CD40L up-regulated TACI expression. Antibodies to TACI were then shown to suppress Ig production [171].

The results of this study show that %TACI⁺ expression was significantly lower in the memory B cell subsets for post-RTX patients compared to HC. TACI MFI expression tended to be lowest in patients at repopulation, although only reaching statistical significance in IgD⁺ resting memory B cells. Whether this reflects a lack of up-regulation of TACI or downregulation due to internalisation or shedding of bound BAFF is not known. Modulation of TACI expression may however render B-cells less responsive to inhibitory signaling through TACI, perhaps by soluble BAFF, allowing easier differentiation to ISC from the post-GC pool.

BBR studies in autoimmune diseases

Few studies have investigated BBR expression in human peripheral blood B cells from different diseases.

First study was developed in 2004, and it investigated MM malignant B cells. They found that peripheral B cells in HC, including naïve, memory and CD5⁺ B1 cells, express BAFFR and TACI (expressed at higher levels in CD27⁺ mature B cells), and no or low BCMA. However, MM cells have variable expression of BAFFR, and express surface BCMA, suggesting a potential role for this receptor in the growth and survival of malignant plasma cells. They also find that BAFF is present in bone marrow sections from MM patients, and MM cells can express BAFF, as opposed to HC. On the whole, they suggest an altered expression of BAFF/BBRs contributing to the progressive accumulation of malignant B cells characteristic of MM [178].

Several studies have focused on BBR expression in SLE B cells. All of them found a lower BAFF-R MFI expression in SLE cells compared to HC [148, 179-181]. Unfortunately most studies do not describe data about the % BBR expression, and only focus on MFI expression, and they do not provide data about current or previous therapies, which could influence such results if patients have previously received B cell depleting agents.

Carter et al described that total surface BAFF-R was not diminished in SLE patients, but available BAFF-R for BAFF was decreased because of prior occupation by increased BAFF. They concluded that B cells from SLE patients were selectively less responsive to exogenous BAFF, consistent with the decreased levels of available receptors on the surface of the cells. According to their results, the occupancy of BAFF-R on B cells could contribute to disease mechanisms in SLE and serve as a biomarker of disease activity. Therefore BAFF-targeting agents would require overcoming the persistent binding of BAFF to BAFF-R [199].

Sellam et al described a reduced MFI BAFF-R expression on peripheral B cells in patients with pSS and SLE compared to HC. None of those patients had received B-cell targeted therapy. They also pointed out that the entire peripheral B cell population expressed BAFF-R, therefore the % BAFF-R expression was not altered. They found a negative correlation between the serum BAFF concentration and BAFF-R level on B cells. They suggested that chronically raised BAFF levels could downregulate BAFF-R expression on the cell surface through post-transcriptional regulation [148].

A 2010 study in SLE by Zhao et al found higher BAFF levels in plasma and decreased BAFFR % and MFI expression in patients with new-onset active disease, explaining such decrease by BAFFR downregulation due to more occupation by elevated BAFF. A strong negative correlation was found between BAFF and the expression rate of BAFFR on B cells. TACI and BCMA expression were upregulated on peripheral B cells in patients with lupus nephritis [181]. Information about current and previous therapy received was not provided.

Koarada et al also described a decreased BAFF-R MFI expression and an increased BCMA MFI expression in RP105- (CD180-) B cells, a subset of pre-plasma cells, compared to HC [180].

A later study by Kim et al found again a significantly lower BAFF-R MFI expression in lupus cells, as well as an increased BCMA MFI expression in plasmablasts, memory and transitional B cells, possibly reflecting a greater degree of B-cell activation [179].

BAFF levels

BAFF levels in pre-BCDT RA patients were similar to healthy controls, as shown in previous studies [57, 70, 71]. At relapse, BAFF levels varied widely but were significantly higher than HC in both post-RTX groups.

In the TTP-RA study, serum BAFF levels were raised in most patients at B-cell return and decreased with time after treatment during remission. Increased serum BAFF levels have been found in acute TTP patients, but acute patients analysed in this study

had already received steroids, which could have normalized BAFF levels. Serum BAFF levels were high at B cell repopulation, but were normalized in long-term remission patients.

Correlation between BAFFR expression and BAFF levels

In the RA study, the correlation of serum BAFF levels with %BAFF-R+ve cells in transitional and naïve mature B cells, as well as in the memory B cell subsets was very strong. This fact suggests that the consequences of high BAFF levels in RA patients may play a role in B-cell survival and reconstitution of the peripheral B-cell pool after B cell depletion therapy. No correlation is seen for plasmablasts though, reflecting that BAFFR would be lost before the plasmablast stage, promoting B cell differentiation towards ISC [196] but not B-cell activation per se [138].

In the TTP study, there was a strong negative association between the concentration of serum BAFF and BAFF-R (% and MFI) expression in patients in long-term remission. That result suggests that, after RTX, one of the key factors contributing to low %BAFF-R+ cells and in particular low BAFF-R expression (MFI), was a strong negative association with the concentration of serum BAFF. Levels of BAFF above those present in normal serum have previously been shown to modulate BAFF-R expression in the absence of productive NFkB signaling *in vitro* [138]. In the current study, even modest levels of serum BAFF, within normal limits, appeared to be significantly inversely associated with BAFF-R expression, but not with the number of CD19 + B-cells per se, in patients with TTP during remission.

BAFF binding to BAFF-R is necessary for B-cell survival and is associated with productive signalling through NFkB in mice [200]. *In vitro*, it has been shown that exogenous BAFF reduces BAFF-R expression due to internalisation or perhaps shedding of BAFF-R [148]. In other experiments BAFF has been shown to enhance T-dependent (CD40L+IL2, IL4, IL10) differentiation in human B-cells to ISC, and gaining a CD27^{hi} BCMA⁺ phenotype. In contrast, BAFF added to B-cells following T-independent stimulation using CpG, IL2 and IL15 inhibited immunoglobulin production [138]. In HC, naïve transitional B-cells are usually prevented from differentiating into ISC when stimulated through their BCR, even in the presence of both T-dependent and T-independent co-stimulation. That could reflect an early negative check-point to prevent naïve B-cell activation by soluble antigen.

The low percentage of BAFF-R⁺ B-cells in early naïve populations found here could conceivably result in less viable B-cells able to enter follicular or GC- pools. However as B-cells exiting the bone marrow in RA patients have been reported to have a high proportion of autoreactive BCR, reduced survival of these newly exiting B cells may be overcome by ‘inappropriate’ positive signalling through the BCR in these naïve populations [10, 66, 201]. This may potentially result in rapid differentiation toward ISC, which would concur with B-cell phenotype distribution in C-R patients.

The effect of high BAFF levels on BAFF-R expression and survival potential may also increase the competition between normal and autoreactive B-cells. Selection into the post-GC pool may be determined by BCR specificity. It is therefore possible that expansion and maturation into ISC of certain autoreactive B-cell populations with a survival advantage (such as RhF-B-cells), will be favoured under these conditions

[202]. RhF-B-cells are ‘promiscuous’ and can obtain help from T cells with a variety of specificities [42]. These autoreactive B cells would therefore undergo preferential selection and expansion to a level critical for clinical relapse to occur.

Correlation between BAFFR expression and time after repopulation/RTX infusion

In the RA study, there is a clear correlation between the time after B cell repopulation and BAFFR expression, reaching statistical significance for % and MFI expression in naïve transitional and post-GC B cells, and for % expression in naïve mature B cells.

Results analyzed for long-term remission TTP after RTX also show that BAFFR % expression increases gradually with time after the RTX infusion. Accurate repopulation data are not available for those patients, therefore they have not been used. In the TTP patients in remission studied, a lower BAFF-R MFI expression compared to HC remains for years after BCDT.

BBR receptor expression mimics ontogeny and is reduced at repopulation after BCDT as it is in neonatal B cells as described in Kaur’s study, showing that it translates into functional differences reflected by reduced B cell proliferation after stimulation with human recombinant BAFF and anti-IgM [136]. The hypothesis concluded in this study is that a similar situation would happen in repopulating B cells after BCDT.

In fact, the findings in the TTP study can represent a contributory mechanism for the delay in disease return. It appears that as a consequence of RTX removing a large proportion of the mature B cell pool, the naïve B cells generated thereafter show a marked down regulation of BAFF-R expression, inversely related to serum BAFF levels. Expansion of repopulating naïve B-cells with low numbers of BAFF-R per cell into such a BAFF-rich environment seems to conversely have a negative effect on expression of BAFF-R expression.

Limitations of the study

Main limitations of the study are related to retrospective or transversal studies, or are either due to the small number of patients. The relapse criteria used at UCL is based on disease activity, CRP levels, and RHF variations, and does not focus on DAS-28 scores.

The number of patients included in the experimental studies is small, due to the difficulty in finding available patients who would qualify for the studies. There were very few available TTP patients, specially previous to receiving their RTX therapy. Data in TTP patients are often incomplete, since the protocol followed in the hematology clinic does not include determination of CD19 counts or other data.

TACI studies in RA post-RTX patients are not conclusive, because memory B cell numbers is reduced for a long time after the treatment, therefore the calculation of TACI is difficult in this kind of experiment. Regarding BCMA, this receptor is usually

present in plasma cells, and not in peripheral B cells, so the calculations of this receptor in peripheral blood has a limited value, again without conclusive results.

The comparative study between RA and TTP patients at repopulation after RTX was performed with fresh samples for RA. However, frozen samples had to be used in TTP, because fresh ones were unavailable; freezing the sample should not modify the B subpopulation studies or BAFF-R+ve % expression, but it can modify BAFF-R MFI expression, therefore this study did not focus on that parameter.

Finally, when reviewing the available literature, most authors provide data about the MFI expression of the BBRs studied, but not of the % expression, which made data interpretation more difficult. These studies have focused on BBR % expression because results are less variable.

CONCLUSIONS

- There are two patterns of relapse after repopulation in patients with RA treated with RTX, with a higher frequency of concordant patients (70 % of the patients) identified in the current study.
- The retreatment scheme for RA patients on BCDT would be initially based on the treat-to-target strategy, so as to reach remission of the disease or a low disease activity. In case of persistent disease activity, up to three consecutive cycles can be given, since B cell depletion in solid tissues is slower. Once the disease is in remission, a further cycle would be given as soon as first clinical or analytical signs (rise in CRP levels or autoantibody levels) of disease activity appear. Further pre-emptive cycles would be given according to the previous cycle duration, retreating patients usually one month before the expected time of relapse.
- Monitoring of B cell depletion and repopulation by high-sensitivity flow cytometry is useful for identifying the duration of the cycle for each patient and predicting further relapses. This procedure can be standardized in daily clinical practice. Secondary adverse events and cost of the therapy may be reduced if this strategy is applied.
- The process of B-cell repopulation after RTX in patients with RA and TTP follows a similar pattern to ontogeny, with a higher frequency of naïve B cells and a delayed regeneration of the memory B-cell pool. The study of TTP patients in

remission allows the analysis of long-term changes that RTX causes in B cell subpopulations, since patients can remain in long-term remission after one cycle of RTX, as opposed to RA patients.

- BAFF-R expression is lowest at peripheral B cell repopulation after RTX in RA (patients with a C-R pattern) and TTP patients, and tends to increase with time after repopulation, mimicking ontogeny, although not reaching the previous values seen in patients naïve to RTX. TACI and BCMA expression studies in RA pre and post-RTX patients do not provide additional data.
- The mechanism of relapse in C-R patients would then be independent of the BAFF/BBR system, since the new-born (transitional) B cells would have a decreased BAFFR expression, unable to bind the increased levels of BAFF. Factors unrelated to B cells can also play an important role in this subgroup of patients.
- RA patients relapsing months after repopulation (D-R) probably need a critical mass of autoreactive B cells to relapse and would have time to “normalize” their BBR expression, so their mechanism of relapse would follow a more “normal” pathway.
- RTX produces long-term changes in B-cell phenotypes and BAFF-R expression, even after only one cycle of treatment, as seen in remission TTP patients. The fact that naïve B-cells (IgD+CD27-) predominate for such long periods after RTX, together with down-regulation of receptors for BAFF, may indirectly contribute to

the delay in disease re-activation in patients with TTP and probably in D-R RA patients.

- Monitoring of different B cell sub-populations and BAFF-R expression in patients with TTP following RTX may provide a cellular monitor for factors associated with prolonging remission, as seen in TTP patients in remission and possibly in RA patients with a D-R pattern.
- Although the study has identified differences in BBR expression in C-R and D-R patients, monitoring of BAFF serum levels and BBR expression is not conclusive to predict the pattern of relapse in the RA patient treated with RTX, therefore it cannot be suggested for daily clinical practice.

BIBLIOGRAPHY

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW: Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376(9746), 1094-1108 (2010).
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.*: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31(3), 315-324 (1988).
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ *et al.*: 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69(9), 1580-1588 (2010).
4. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR *et al.*: Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*, (2015).
5. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC *et al.*: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73(3), 492-509 (2014).
6. Rantapaa-Dahlqvist S, De Jong BA, Berglin E *et al.*: Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(10), 2741-2749 (2003).
7. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM: Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 97(2), 188-196 (1999).
8. Nemazee D, Buerki K: Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20), 8039-8043 (1989).
9. Fulcher DA, Basten A: Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med* 179(1), 125-134 (1994).
10. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E: Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 201(10), 1659-1667 (2005).
11. Leandro MJ: B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res Ther* 15 Suppl 1, S3 (2013).
12. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R: Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188(9), 1679-1689 (1998).
13. Fecteau JF, Cote G, Neron S: A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177(6), 3728-3736 (2006).
14. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V *et al.*: Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118(8), 2150-2158 (2011).
15. Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM: Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations

- in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 167(7), 3610-3618 (2001).
16. Odegard VH, Schatz DG: Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6(8), 573-583 (2006).
17. Chaudhuri J, Alt FW: Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4(7), 541-552 (2004).
18. Weill JC, Weller S, Reynaud CA: Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 27, 267-285 (2009).
19. MacLennan IC: Germinal centers. *Annual review of immunology* 12, 117-139 (1994).
20. Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM: T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7(3), 349-354 (1995).
21. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA *et al.*: B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol* 165(5), 2474-2480 (2000).
22. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH: B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22(3), 307-315 (2010).
23. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM: T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167(8), 4710-4718 (2001).
24. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ *et al.*: IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15(10), 3266-3274 (1997).
25. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA *et al.*: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90(6), 2188-2195 (1997).
26. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ: The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8, 140-174 (2005).
27. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP: Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44(16), 3823-3837 (2007).
28. Reff ME, Carner K, Chambers KS *et al.*: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83(2), 435-445 (1994).
29. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 63(6), 1424-1433 (1984).
30. Leandro MJ, Cooper N, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Bone marrow B-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy. *Rheumatology (Oxford)* 46(1), 29-36 (2007).
31. Teng YK, Wheeler G, Hogan VE *et al.*: Induction of long-term B-cell depletion in refractory rheumatoid arthritis patients preferentially affects autoreactive more than protective humoral immunity. *Arthritis Res Ther* 14(2), R57 (2012).
32. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J *et al.*: Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25), 2572-2581 (2004).
33. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 12(4), 387-398 (1993).

34. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C *et al.*: B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27⁺ B cells. *Exp Hematol* 33(4), 480-486 (2005).
35. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K: Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol* 167(1), 15-25 (2012).
36. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(2), 613-620 (2006).
37. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP: Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(8), 2377-2386 (2006).
38. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B *et al.*: B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol* 122(2), 139-145 (2007).
39. Anolik JH, Barnard J, Owen T *et al.*: Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 56(9), 3044-3056 (2007).
40. Thurlings RM, Teng O, Vos K *et al.*: Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(2), 409-412 (2010).
41. Reddy V, Croca S, Gerona D *et al.*: Serum rituximab levels and efficiency of B cell depletion: differences between patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 52(5), 951-952 (2013).
42. Roosnek E, Lanzavecchia A: Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 173(2), 487-489 (1991).
43. Edwards JC, Cambridge G: Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 40(2), 205-211 (2001).
44. Van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd *et al.*: Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis* 72(9), 1496-1502 (2013).
45. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW *et al.*: Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 54(9), 2793-2806 (2006).
46. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A *et al.*: The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 54(5), 1390-1400 (2006).
47. Rubbert-Roth A, Tak PP, Zerbini C *et al.*: Efficacy and safety of various repeat treatment dosing regimens of rituximab in patients with active rheumatoid

- arthritis: results of a Phase III randomized study (MIRROR). *Rheumatology (Oxford)* 49(9), 1683-1693 (2010).
48. Emery P, Deodhar A, Rigby WF *et al.*: Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis* 69(9), 1629-1635 (2010).
 49. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N *et al.*: Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70(6), 909-920 (2011).
 50. Boumans MJ, Thurlings RM, Gerlag DM, Vos K, Tak PP: Response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis in different compartments of the immune system. *Arthritis Rheum* 63(11), 3187-3194 (2011).
 51. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S *et al.*: B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis Rheum* 63(4), 933-938 (2011).
 52. Roll P, Dorner T, Tony HP: Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 58(6), 1566-1575 (2008).
 53. Vital EM, Rawstron AC, Dass S *et al.*: Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis Rheum* 63(3), 603-608 (2011).
 54. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P: Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(10), 2993-2999 (2008).
 55. Vital EM, Dass S, Rawstron AC *et al.*: Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis Rheum* 62(5), 1273-1279 (2010).
 56. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D *et al.*: B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 50(8), 2580-2589 (2004).
 57. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H *et al.*: Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63(12), 3692-3701 (2011).
 58. Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K *et al.*: Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in *Macaca fascicularis*. *J Immunother* 28(3), 212-219 (2005).
 59. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, Bokarewa MI, Brisslert M: Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11(4), R123 (2009).
 60. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P *et al.*: Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 11(4), R131 (2009).
 61. Kamburova EG, Koenen HJ, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I: In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant* 12(2), 341-350 (2012).

62. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC *et al.*: Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(8), 2146-2154 (2003).
63. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JCW: Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 46(4), 626-630 (2007).
64. Moller B, Aeberli D, Eggli S *et al.*: Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11(3), R62 (2009).
65. Van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd *et al.*: Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol* 37(3), 558-567 (2010).
66. De La Torre I, Leandro MJ, Valor L, Becerra E, Edwards JC, Cambridge G: Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. *Rheumatology (Oxford)*, (2012).
67. Becerra E, Cambridge G, De La Torre I, Leandro Mj: Long-term safety of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol*. 7(4), 383-390 (2012).
68. Gong Q, Ou Q, Ye S *et al.*: Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174(2), 817-826 (2005).
69. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP: Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 67(7), 917-925 (2008).
70. Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC: Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 54(3), 723-732 (2006).
71. De La Torre I, Moura RA, Leandro MJ, Edwards J, Cambridge G: B-cell-activating factor receptor expression on naive and memory B cells: relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following B-cell depletion therapy. *Ann Rheum Dis* 69(12), 2181-2188 (2010).
72. Cambridge G, Perry HC, Nogueira L *et al.*: The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasmablast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J Autoimmun* 50, 67-76 (2014).
73. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G: Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 61(10), 883-888 (2002).
74. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC: Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 46(4), 626-630 (2007).
75. Leandro MJ, Becerra-Fernandez E: B-cell therapies in established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25(4), 535-548 (2011).
76. Mease PJ, Cohen S, Gaylis NB *et al.*: Efficacy and safety of retreatment in patients with rheumatoid arthritis with previous inadequate response to tumor

- necrosis factor inhibitors: results from the SUNRISE trial. *J Rheumatol* 37(5), 917-927 (2010).
77. Keystone E, Fleischmann R, Emery P *et al.*: Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum* 56(12), 3896-3908 (2007).
78. De La Torre I Leandro M, Gerona D, Valor L, Carreno L and Cambridge G: Impact of non-fixed versus 6 month fixed retreatment schedules on serum immunoglobulins following rituximab in patients with rheumatoid arthritis *J Clin Cell Immunol S6: 005.*, (2013).
79. Mukhtyar C, Flossmann O, Hellmich B *et al.*: Outcomes from studies of antineutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis: a systematic review by the European League Against Rheumatism systemic vasculitis task force. *Ann Rheum Dis* 67(7), 1004-1010 (2008).
80. Smith KG, Jones RB, Burns SM, Jayne DR: Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 54(9), 2970-2982 (2006).
81. Jones RB, Ferraro AJ, Chaudhry AN *et al.*: A multicenter survey of rituximab therapy for refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 60(7), 2156-2168 (2009).
82. Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U: Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am J Respir Crit Care Med* 173(2), 180-187 (2006).
83. Stone JH, Merkel PA, Spiera R *et al.*: Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 363(3), 221-232 (2010).
84. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T *et al.*: Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 363(3), 211-220 (2010).
85. Calvo-Alen J, Silva-Fernandez L, Ucar-Angulo E *et al.*: SER consensus statement on the use of biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Reumatol Clin* 9(5), 281-296 (2013).
86. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ: The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 169, 107-121 (1999).
87. Furie R, Petri M, Zamani O *et al.*: A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63(12), 3918-3930 (2011).
88. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA: An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46(10), 2673-2677 (2002).
89. Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA: B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)* 44(12), 1542-1545 (2005).
90. Ng KP, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Cambridge G, Isenberg DA: Repeated B cell depletion in treatment of refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65(7), 942-945 (2006).
91. Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M *et al.*: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 54(11), 3612-3622 (2006).

92. Ng KP, Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein M, Isenberg DA: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 66(9), 1259-1262 (2007).
93. Lu TY, Ng KP, Cambridge G *et al.*: A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London Hospital: the first fifty patients. *Arthritis Rheum* 61(4), 482-487 (2009).
94. Edwards JC, Cambridge G, Leandro MJ: B cell depletion therapy in rheumatic disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(5), 915-928 (2006).
95. Sfrikakis PP, Boletis JN, Tsokos GC: Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol* 17(5), 550-557 (2005).
96. Jonsdottir T, Gunnarsson I, Risselada A, Henriksson EW, Klareskog L, Van Vollenhoven RF: Treatment of refractory SLE with rituximab plus cyclophosphamide: clinical effects, serological changes, and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 67(3), 330-334 (2008).
97. Terrier B, Amoura Z, Ravaud P *et al.*: Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum* 62(8), 2458-2466 (2010).
98. Iaccarino L, Bartoloni E, Carli L *et al.*: Efficacy and safety of off-label use of rituximab in refractory lupus: data from the Italian Multicentre Registry. *Clin Exp Rheumatol* 33(4), 449-456 (2015).
99. Fernandez-Nebro A, De La Fuente JL, Carreno L *et al.*: Multicenter longitudinal study of B-lymphocyte depletion in refractory systemic lupus erythematosus: the LESIMAB study. *Lupus* 21(10), 1063-1076 (2012).
100. Pepper R, Griffith M, Kirwan C *et al.*: Rituximab is an effective treatment for lupus nephritis and allows a reduction in maintenance steroids. *Nephrol Dial Transplant* 24(12), 3717-3723 (2009).
101. Diaz-Lagares C, Croca S, Sangle S *et al.*: Efficacy of rituximab in 164 patients with biopsy-proven lupus nephritis: pooled data from European cohorts. *Autoimmun Rev* 11(5), 357-364 (2012).
102. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ *et al.*: Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum* 62(1), 222-233 (2010).
103. Rovin BH, Furie R, Latinis K *et al.*: Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum* 64(4), 1215-1226 (2012).
104. Kroese FG, Abdulahad WH, Haacke E, Bos NA, Vissink A, Bootsma H: B-cell hyperactivity in primary Sjogren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 10(4), 483-499 (2014).
105. Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J *et al.*: Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 57(2), 310-317 (2007).
106. Dass S, Bowman SJ, Vital EM *et al.*: Reduction of fatigue in Sjogren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann Rheum Dis* 67(11), 1541-1544 (2008).

107. Gottenberg JE, Cinquetti G, Larroche C *et al.*: Efficacy of rituximab in systemic manifestations of primary Sjogren's syndrome: results in 78 patients of the AutoImmune and Rituximab registry. *Ann Rheum Dis* 72(6), 1026-1031 (2013).
108. Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S *et al.*: Treatment of primary Sjogren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 160(4), 233-242 (2014).
109. Brown S, Navarro Coy N, Pitzalis C *et al.*: The TRACTISS protocol: a randomised double blind placebo controlled clinical trial of anti-B-cell therapy in patients with primary Sjogren's Syndrome. *BMC Musculoskelet Disord* 15, 21 (2014).
110. Dalakas MC, Hohlfield R: Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362(9388), 971-982 (2003).
111. Lambotte O, Kotb R, Maigne G, Blanc FX, Goujard C, Delfraissy JF: Efficacy of rituximab in refractory polymyositis. *J Rheumatol* 32(7), 1369-1370 (2005).
112. Mok CC, Ho LY, To CH: Rituximab for refractory polymyositis: an open-label prospective study. *J Rheumatol* 34(9), 1864-1868 (2007).
113. Majmudar S, Hall HA, Zimmermann B: Treatment of adult inflammatory myositis with rituximab: an emerging therapy for refractory patients. *J Clin Rheumatol* 15(7), 338-340 (2009).
114. Munoz-Beamud F, Isenberg DA: Rituximab as an effective alternative therapy in refractory idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol* 31(6), 896-903 (2013).
115. Oddis CV, Reed AM, Aggarwal R *et al.*: Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum* 65(2), 314-324 (2013).
116. Scully M, McDonald V, Cavenagh J *et al.*: A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 118(7), 1746-1753 (2011).
117. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 89(9), 3097-3103 (1997).
118. Furlan M, Robles R, Galbusera M *et al.*: von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 339(22), 1578-1584 (1998).
119. Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheiflinger F: IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 7(10), 1703-1710 (2009).
120. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S *et al.*: Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* 158(3), 323-335 (2012).
121. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA: Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 8(6), 1201-1208 (2010).
122. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 98(4), 952-957 (2001).

123. Heidel F, Lipka DB, Von Auer C, Huber C, Scharrer I, Hess G: Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. *Thromb Haemost* 97(2), 228-233 (2007).
124. Scully M, Cohen H, Cavenagh J *et al.*: Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol* 136(3), 451-461 (2007).
125. Froissart A, Buffet M, Veyradier A *et al.*: Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med* 40(1), 104-111 (2012).
126. Westwood JP, Webster H, McGuckin S, McDonald V, Machin SJ, Scully M: Rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura: benefit of early administration during acute episodes and use of prophylaxis to prevent relapse. *J Thromb Haemost* 11(3), 481-490 (2013).
127. Scully M: Rituximab in the treatment of TTP. *Hematology* 17 Suppl 1, S22-24 (2012).
128. Moore PA, Belvedere O, Orr A *et al.*: BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285(5425), 260-263 (1999).
129. Schneider P, Mackay F, Steiner V *et al.*: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189(11), 1747-1756 (1999).
130. Bossen C, Schneider P: BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18(5), 263-275 (2006).
131. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J: BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annual review of immunology* 21, 231-264 (2003).
132. Mackay F, Schneider P: Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9(7), 491-502 (2009).
133. Day ES, Cachero TG, Qian F *et al.*: Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 44(6), 1919-1931 (2005).
134. Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A: Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol* 10(13), 785-788 (2000).
135. Salzer U, Jennings S, Grimbacher B: To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. *Eur J Immunol* 37(1), 17-20 (2007).
136. Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR: Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 110(8), 2948-2954 (2007).
137. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U *et al.*: Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol* 188(1), 497-503 (2012).
138. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF: Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179(11), 7276-7286 (2007).

139. Bishop GA, Hostager BS, Brown KD: Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 72(1), 19-23 (2002).
140. Bishop GA: The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol* 4(10), 775-786 (2004).
141. Ni CZ, Oganessian G, Welsh K *et al.*: Key molecular contacts promote recognition of the BAFF receptor by TNF receptor-associated factor 3: implications for intracellular signaling regulation. *J Immunol* 173(12), 7394-7400 (2004).
142. Miller JP, Stadanlick JE, Cancro MP: Space, selection, and surveillance: setting boundaries with BLyS. *J Immunol* 176(11), 6405-6410 (2006).
143. Cancro MP, D'cruz DP, Khamashta MA: The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 119(5), 1066-1073 (2009).
144. Cancro MP: The BLyS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation. *Immunol Rev* 202, 237-249 (2004).
145. Thien M, Phan TG, Gardam S *et al.*: Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20(6), 785-798 (2004).
146. Hondowicz BD, Alexander ST, Quinn WJ, 3rd *et al.*: The role of BLyS/BLyS receptors in anti-chromatin B cell regulation. *Int Immunol* 19(4), 465-475 (2007).
147. Cancro MP: Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat Rev Immunol* 9(9), 657-661 (2009).
148. Sellam J, Miceli-Richard C, Gottenberg JE *et al.*: Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 66(6), 790-797 (2007).
149. Thomas MR, Machin SJ, Mackie I, Scully MA: B cell activating factor is elevated in acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 155(5), 620-622 (2011).
150. Darce JR, Arendt BK, Chang SK, Jelinek DF: Divergent effects of BAFF on human memory B cell differentiation into Ig-secreting cells. *J Immunol* 178(9), 5612-5622 (2007).
151. Goenka R, Scholz JL, Sindhava VJ, Cancro MP: New roles for the BLyS/BAFF family in antigen-experienced B cell niches. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(2), 107-113 (2014).
152. Goenka R, Matthews AH, Zhang B *et al.*: Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med* 211(1), 45-56 (2014).
153. Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC *et al.*: B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis* 67(7), 1011-1016 (2008).
154. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X: Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 66(5), 700-703 (2007).

155. Ng LG, Sutherland AP, Newton R *et al.*: B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173(2), 807-817 (2004).
156. Yan M, Brady JR, Chan B *et al.*: Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11(19), 1547-1552 (2001).
157. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M *et al.*: B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33), 13945-13950 (2009).
158. Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM: BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human pathology* 36(10), 1113-1119 (2005).
159. Hardy RR, Hayakawa K: B cell development pathways. *Annual review of immunology* 19, 595-621 (2001).
160. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE: Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105(11), 4390-4398 (2005).
161. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H: Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity* 26(2), 205-213 (2007).
162. Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP: Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 168(12), 5993-5996 (2002).
163. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ *et al.*: Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 280(8), 7218-7227 (2005).
164. Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD *et al.*: BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* 169(8), 4314-4321 (2002).
165. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE: Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology* 26, 261-292 (2008).
166. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM *et al.*: DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3(9), 822-829 (2002).
167. Pan-Hammarstrom Q, Salzer U, Du L *et al.*: Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet* 39(4), 429-430 (2007).
168. He B, Santamaria R, Xu W *et al.*: The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* 11(9), 836-845 (2010).
169. Castigli E, Wilson SA, Scott S *et al.*: TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201(1), 35-39 (2005).
170. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS: Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 18(2), 279-288 (2003).
171. Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T: TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol* 37(1), 110-118 (2007).

172. Sakurai D, Hase H, Kanno Y, Kojima H, Okumura K, Kobata T: TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* 109(7), 2961-2967 (2007).
173. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L *et al.*: TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 37(8), 829-834 (2005).
174. Salzer U, Chapel HM, Webster AD *et al.*: Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 37(8), 820-828 (2005).
175. Castigli E, Wilson SA, Elkhail A, Ozcan E, Garibyan L, Geha RS: Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 120(4), 885-891 (2007).
176. Gras MP, Laabi Y, Linares-Cruz G *et al.*: BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *Int Immunol* 7(7), 1093-1106 (1995).
177. O'connor BP, Raman VS, Erickson LD *et al.*: BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199(1), 91-98 (2004).
178. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK *et al.*: Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103(2), 689-694 (2004).
179. Kim J, Gross JA, Dillon SR, Min JK, Elkon KB: Increased BCMA expression in lupus marks activated B cells, and BCMA receptor engagement enhances the response to TLR9 stimulation. *Autoimmunity* 44(2), 69-81 (2011).
180. Koarada S, Tada Y, Sohma Y *et al.*: Autoantibody-producing RP105(-) B cells, from patients with systemic lupus erythematosus, showed more preferential expression of BCMA compared with BAFF-R than normal subjects. *Rheumatology (Oxford)* 49(4), 662-670 (2010).
181. Zhao LD, Li Y, Smith MF, Jr. *et al.*: Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus* 19(13), 1534-1549 (2010).
182. Leandro MJ, Cambridge G: Expression of B cell activating factor (BAFF) and BAFF-binding receptors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 40(8), 1247-1250 (2013).
183. Edwards JC, Cambridge G, Leandro MJ: Repeated B-cell depletion in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 46(9), 1509 (2007).
184. Blanco F.J. Cañete J.D., Pablos J.L.: Técnicas de investigación básica en reumatología. 2, 43-54 (2005).
185. Schaffer AA, Pfannstiel J, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L, Grimbacher B: Analysis of families with common variable immunodeficiency (CVID) and IgA deficiency suggests linkage of CVID to chromosome 16q. *Hum Genet* 118(6), 725-729 (2006).
186. Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK: The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* 2, 81 (2011).
187. Quartuccio L, Di Bidino R, Ruggeri M *et al.*: Cost-effectiveness analysis of two Rituximab retreatment regimens for longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, (2015).

188. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G: B lymphocyte depletion therapy with rituximab in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 30(2), 393-403, viii (2004).
189. Emery P, Mease PJ, Rubbert-Roth A *et al.*: Retreatment with rituximab based on a treatment-to-target approach provides better disease control than treatment as needed in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective pooled analysis. *Rheumatology (Oxford)* 50(12), 2223-2232 (2011).
190. Smith V, Van Praet JT, Vandooren B *et al.*: Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: an open-label clinical and histopathological study. *Ann Rheum Dis* 69(1), 193-197 (2010).
191. Dudler J, Finckh A, Kyburz D *et al.*: Swiss consensus statement: Recommendations for optimising re-treatment with MabThera (rituximab) in rheumatoid arthritis. *Swiss Med Wkly* 140, w13073 (2010).
192. Reiche BE, Ohrndorf S, Feist E, Messerschmidt J, Burmester GR, Backhaus M: Usefulness of power Doppler ultrasound for prediction of re-therapy with rituximab in rheumatoid arthritis: a prospective study of longstanding rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 66(2), 204-216 (2014).
193. Muhammad K, Roll P, Einsele H, Dorner T, Tony HP: Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 60(8), 2284-2293 (2009).
194. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y: Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, (2013).
195. Ireland JM, Unanue ER: Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system. *Autophagy* 8(3), 429-430 (2012).
196. Avery DT, Kallal SL, Ellyard JI *et al.*: BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112(2), 286-297 (2003).
197. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A *et al.*: TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 111(3), 1004-1012 (2008).
198. Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA: TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 6(5), 357-362 (2006).
199. Carter RH, Zhao H, Liu X *et al.*: Expression and occupancy of BAFF-R on B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52(12), 3943-3954 (2005).
200. Cancro MP: Living in context with the survival factor BAFF. *Immunity* 28(3), 300-301 (2008).
201. Rudnicka W, Burakowski T, Warnawin E *et al.*: Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 39(5), 1211-1220 (2009).
202. Edwards JC, Cambridge G: B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 6(5), 394-403 (2006).

ANEXO

Publicaciones derivadas del estudio:

- **Becerra E**, Scully MA, Leandro MJ, Heelas EO, Westwood JP, De La Torre I, Cambridge G. *Effect of rituximab on B-cell phenotype and serum B-cell activating factor levels in patients with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. Clin Exp Immunol. 2015 Mar;179(3):414-25.
- *Expression of B-cell activating factor-binding receptors on B-cell subsets from patients with rheumatoid arthritis relapsing after B cell depletion therapy based on Rituximab. Relationship with time after peripheral B cell repopulation* (artículo en preparación).
- *Patterns of relapse in the Rheumatoid Arthritis cohort treated with Rituximab at University College London* (artículo en preparación).

Publicaciones relacionadas:

- **Becerra E**, Cambridge G, de la Torre I, Leandro MJ. *Long-term safety of rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. Int J Clin Rheumatol 2012 Aug;7(4):383-390.
- De la Torre I, Leandro MJ, Valor L, **Becerra E**, Edwards JC, Cambridge G. *Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles*

based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. Rheumatology (Oxford). 2012 May;51(5):833-40.

- Leandro M, **Becerra-Fernández E**. *B cell therapies in established Rheumatoid Arthritis*. Best Prat Res Clin Rheumatol 2011 Aug 25(4):535-48.

Effect of rituximab on B cell phenotype and serum B cell-activating factor levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura

E. Becerra,* M. A. Scully,[†]
M. J. Leandro,* E. O. Heelas,[†]
J.-P. Westwood,[†] I. De La Torre[‡] and
G. Cambridge*

Departments of *Rheumatology and

[†]Haematology, University College London,
London, UK, and [‡]Servicio de Reumatología,
Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Summary

Autoantibodies inhibiting the activity of the metalloproteinase, ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13), underlie the pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Rituximab (RTX) combined with plasma-exchange (PEX) is an effective treatment in TTP. Patients can remain in remission for extended periods following PEX/RTX, and this is associated with continuing reduction in antibodies to ADAMTS13. Factors controlling B cell differentiation to autoantibody production, including stimulation through the B cell receptor and interactions with the B cell-activating factor (BAFF), may thus impact length of remission. In this cross-sectional study, we measured naive and memory B cell phenotypes [using CD19/immunoglobulin (Ig)D/CD27] following PEX/RTX treatment in TTP patients at B cell return ($n = 6$) and in 12 patients in remission 10–68 months post-RTX. We also investigated relationships among serum BAFF, soluble CD23 (sCD23⁻ a surrogate measure of acquiring B memory (CD27⁺) phenotype) and BAFF receptor (BAFF-R) expression. At B cell return after PEX/RTX, naive B cells predominated and BAFF-R expression was reduced compared to healthy controls ($P < 0.001$). In the remission group, despite numbers of CD19⁺ B cells within normal limits in most patients, the percentage and absolute numbers of pre-switch and memory B cells remained low, with sCD23 levels at the lower end of the normal range. BAFF levels were correlated inversely with BAFF-R expression and time after therapy. In conclusion, the long-term effects of RTX therapy in patients with TTP included slow regeneration of memory B cell subsets and persistently reduced BAFF-R expression across all B cell subpopulations. This may reflect the delay in selection and differentiation of potentially autoreactive (ADAMTS13-specific) B cells, resulting in relatively long periods of low disease activity after therapy.

Keywords: BAFF, BAFF-R, B cells, rituximab, TTP

Accepted for publication 9 October 2014

Correspondence: G. Cambridge, Centre for
Rheumatology Research, Division of Medicine,
University College London, Rayne Building, 5
University Street, London WC1E 6JF, UK.

E-mail: g.cambridge@ucl.ac.uk

Introduction

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is an acquired, life-threatening disease characterized by thrombocytopenia, microangiopathic haemolytic anaemia and signs of organ dysfunction, including neurological, cardiac, renal and abdominal symptoms [1]. It is due to deficiency or dysfunction of the metalloproteinase ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13), which cleaves von Willebrand factor, with resulting increased platelet adhesion and

thrombus formation in small blood vessels [2,3]. Most cases are associated with the production of autoantibodies [immunoglobulin (Ig)M/IgG/IgA] to ADAMTS13, of which the most predominant subclasses are IgG4, followed by IgG1 [4]. Plasma exchange (PEX) and corticosteroids are the standard therapies, but many patients require additional immunosuppression [5].

B cell depletion therapy based on rituximab (RTX; a chimeric monoclonal antibody against the pan-B cell marker, CD20) was first used to treat patients with non-Hodgkin's lymphoma [6], and is now also used widely in autoimmune

diseases such as rheumatoid arthritis (RA) [7] and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis [8]. The inclusion of RTX in the treatment of acute TTP has significantly improved clinical outcome in these patients, who achieve higher response rates and greatly increased median times to relapse compared with PEX alone [9–13]. In addition, consideration of pre-emptive rituximab treatment (as monotherapy) has been suggested in cases where severe ADAMTS13 deficiency persists during TTP remission in order to prevent subsequent flare [13,14].

The development of the normal B cell repertoire through to antibody secretion by daughter plasma cells is largely dependent upon the concerted expression of the three different receptors for cytokine B cell activating factor BAFF, with levels of expression varying over the different stages of B cell differentiation [15]. BAFF-R (BR3), however, is expressed on all circulating B cell subsets. Transitional (early naive) human B cells are most sensitive to prosurvival signals delivered by BAFF through BAFF-R prior to activation through the B cell receptor (BCR) [16]. Low or faulty expression of BAFF-R in primary immunodeficiency results in low levels of serum IgM and IgG, increased numbers of transitional B cells and strongly reduced T independent immune responses [17]. Serum BAFF levels before RTX are reportedly increased in some TTP patients at presentation, and to rise following treatment with RTX [18]. This is similar to what has been described for other autoimmune diseases [19–21].

Immunophenotyping of B cells using monoclonal antibodies to CD19 (a pan-B cell marker), IgD and CD27 allows identification of naive and antigen-experienced B cell subpopulations, namely naive ($\text{IgD}^+\text{CD27}^-$), pre-switch memory ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$), switched memory ($\text{IgD}^-\text{CD27}^+$) and $\text{IgD}^-\text{CD27}^-$ resting memory B cells [22,23]. The maturation of naive B cells to memory status (often accompanied by class-switch recombination), is usually associated with gain of CD27 expression [24] and is largely dependent upon interactions with T cells and with Toll-like receptors (TLR) [25].

Remission after PEX/RTX can last for long periods of time after B cell return in TTP patients and is related to the continuation of a reduction in the production of IgG anti-ADAMTS13 antibodies [26]. It is therefore likely that factors impacting B cell survival and maturation, and differentiation into immunoglobulin secretion are responsible for such extended remissions. In this retrospective study, we explored the dynamics of the BAFF/BAFF-R system in patients with TTP undergoing therapy with RTX by following B cell phenotypes, BAFF-R expression and relationships with serological parameters. In this cross-sectional study, we utilized samples from two time-points after RTX-induced depletion: (i) B cell return and (ii) in patients maintaining long-term remission. Laboratory parameters, serum BAFF levels and circulating soluble CD23 (sCD23) were also

measured. CD23, the low-affinity Fc epsilon receptor II, is expressed on mature naive B cells. Following antigen encounter or activation through TLR, surface expression of CD27 induces cleavage of CD23 and the soluble receptor, sCD23, is released into the circulation [27]. Levels of sCD23 were therefore used as a surrogate marker of B cell maturation to a CD27^+ phenotype following RTX therapy, as described previously [28].

Methods

Patients

Blood samples were obtained from a total of 20 patients with TTP (age range 29–79 years) and 12 healthy controls (HC) (age range 22–59 years). Clinical data are summarized in Table 1. Blood samples were available from patient 1 both at acute admission and at B cell return. Patients were all attending the Department of Haematology at University College London Hospital (UCLH) and treated on the basis of clinical need. In acute presentations of TTP, PEX and corticosteroids were given. At UCLH, RTX is added following confirmation of an autoimmune phenotype, as described previously [1]. RTX was delivered in at least four infusions of 375 mg/m^2 but up to eight infusions, if required, to reduce IgG anti-ADAMTS13 levels and to normalize ADAMTS13 activity [10]. Time after RTX was defined as time since first rituximab infusion. The study had ethical approval and all patients gave informed consent before entering the study (MREC: 08/H0716/72). ADAMTS13 activity levels were documented and values shown in Table 1 were on the day of PBMC collection.

Patients with TTP were divided into three groups, as follows.

- Acute TTP before RTX ($n = 3$). Patients with a *de-novo* acute presentation of TTP associated with significantly decreased ADAMTS13 activity and positive IgG anti-ADAMTS13 antibodies.
- B cell return (first documented) in TTP patients who had achieved clinical remission (sustained normal platelet counts $>150 \times 10^9/\text{l}$) following RTX therapy ($n = 6$). After adequate depletion of B cells in peripheral blood ($<5 \times 10^6 \text{ CD19}^+ \text{ B cells/l}$), first B cell return was defined as when B cell count became equal to or exceeded $5 \times 10^6 \text{ CD19}^+ \text{ B cells/l}$ or rose to $\geq 0.5\%$ of the total lymphocyte count. The word 'documented' repopulation was used because although the patients had $>5 \times 10^6 \text{ CD19}^+ \text{ B cells/l}$ present at that particular clinic visit, the exact time that B cells started repopulating could have occurred at any time between routine visits.
- TTP patients in remission ($n = 12$). TTP patients who remained in clinical remission (platelet count $>150 \times 10^9/\text{l}$) following B cell return, as defined above.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) patients.

	Age	Gender	Platelet count ($\times 10^9/l$)	ADAMTS13 (% normal value)	BAFF (ng/ml)	Months post-RTX	sCD23 (pg/ml)	CD19 ⁺ absolute count ($\times 10^6$)
Acute TTP								
1	65	M	16	26	1.01		3876	n.a.
2	52	M	9	<5	1.11		3284	n.a.
3	53	F	12	<5	1.69		4103	n.a.
B cell return								
1*	65	M	215	96	3.12	10	1026	30
4	64	M	259	40	2.28	7	250	7
5	26	M	299	102	1.69	8	946	143
6	79	F	204	>100	4.30	5	315	2
7	36	F	335	88	4.46	6	2354	7
8#	75	M	35	<5	2.42	5	3564	218
Remission								
9	41	M	174	34	1.56	32	1143	323
10	43	F	265	>100	1.58	44	950	717
11	53	F	288	75	1.17	68	1517	178
12	16	F	277	37	1.42	18	1086	154
13	72	M	475	91	2.86	14	1184	69
14	52	F	289	>100	1.58	29	1382	335
15	63	M	216	58	1.28	31	1001	82
16	45	M	246	<5	0.91	51	1740	1326
17	44	M	191	115	1.30	33	1162	198
18	42	F	274	109	2.35	54	1407	185
19	29	F	544	99	3.26	10	1257	141
20	57	F	279	16	1.01	60	1210	398

(a) Patients 1 and 1* (shown in bold type) serial samples from same individual. (b) #Patient 8: was relapsing at B cell return. (c) Normal ranges given in the Methods. ANAMTS13 = a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13; RTX = rituximab; BAFF = B cell activating factor; n.a. = not applicable.

Assessment of B cell depletion

The normal range for CD19⁺ B cells used by our pathology laboratory was $0.03\text{--}0.40 \times 10^9/l$ (5–15% of lymphocytes). Adequate depletion of B cells in the peripheral blood was deemed to have occurred when CD19⁺ cells $<5 \times 10^6/L$.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation and staining

PBMC were isolated from 10 ml heparinized whole blood from patients and healthy controls and frozen in liquid nitrogen. For fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis, PBMC ($1 \times 10^6/\text{sample}$) from patients and at least one healthy control were thawed and incubated with conjugated antibodies for 20 min in the dark at 4°C. Cells were washed, fixed with paraformaldehyde 2% for 5 min and 300 000 events per sample gated on total lymphocytes acquired with a FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analysed with FlowJo (TreeStar, Stanford University, CA, USA). Absolute cell counts were calculated from routine lymphocyte counts. Acute TTP patient samples were taken before RTX

therapy, but patients had received PEX and steroids on admission.

Phenotypical analysis

Immunophenotyping of PBMC was performed using matched combinations of anti-human murine monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein cyanin (PerCP-Cy5.5) or allophycocyanin (APC). Combinations of anti-CD19 PerCP-Cy5.5, anti-IgD-FITC and anti-CD27-APC were used to define B cell subsets. Expression of BAFF-R on each subset was analysed using anti-BAFF-R-PE (11C1). All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA) or eBioscience (San Diego, CA, USA).

Measurement of BAFF

Serum BAFF levels were quantified using the Human Quantikine® BAFF/BLyS immunoassay ELISA kit (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). The mean ± 3 standard deviations for normal sera given by the manufacturer was 1.17 ± 0.84 ng/ml (2.01 ng/ml). This was therefore used as the normal range upper-level cut-off.

Soluble CD23

Commercial ELISAs were used to measure serum sCD23 (R&D Systems Europe Ltd). The normal range for sCD23 given by the manufacturers was 1235–5024 pg/ml.

ADAMTS13 assays

Plasma ADAMTS13 activity was measured by a fluorescence resonance energy transfer assay [29] and expressed as a percentage relative to the activity in pooled normal plasma (normal range 60–123%; lower limit of detection 5%). IgG antibodies to ADAMTS13 were measured to confirm diagnosis, as described previously (normal range <6.1%) [10].

Statistical analysis

The proportions (%) and absolute number of B cell subsets within the CD19 gate and of CD19 cells expressing BAFF-R [% and mean fluorescence intensity (MFI)] in patient and control groups were compared using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test or, for, normally distributed data, the unpaired *t*-test with Welch's correction. Correlation statistics were used to determine relationships between serum BAFF levels, percentage of BAFF-R-positive cells and expression (MFI), with length of time after RTX and with laboratory parameters. Analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

Clinical characteristics

Table 1 summarizes the clinical characteristics of patients with TTP. Due to the difficulty of collecting samples from these patients before instituting (often emergency) treatment, only three *de-novo* presentations were collected, and therefore these cases have been included in the descriptive, but not the statistical, analyses. All three cases had received PEX and corticosteroids before blood sampling. Of the six TTP patients studied at B cell return (5–10 months after RTX), one patient was undergoing clinical relapse (patient 8). This patient had the highest CD19 absolute count and level of sCD23. In all 12 patients in remission, B cell return was confirmed in samples taken between 10 and 68 months after RTX, with all having CD19 counts within or even exceeding the normal range (Table 1; Fig. 5c).

B cell phenotype in TTP patients after RTX compared with healthy controls

Figure 1a is a representative plot showing B cell phenotypes in CD19-gated PBMC from an HC as defined by the combination of IgD/CD27. Figure 1b shows the distributions of

the same B cell subpopulations in a sample taken from a TTP patient at B cell return. In cross-sectional analyses (Fig. 1c,d) the distribution of B cell subpopulations at B cell return after RTX is compared with HC. Absolute numbers of cells within each B cell subpopulation are plotted in Fig. 1c, percentage of CD19⁺ B cells, and in Fig. 1d. Naive B cells (IgD⁺CD27⁻; Fig. 1b) predominated at B cell return, with their percentage significantly higher than in HC; pre-switch memory (IgD⁺CD27⁺) populations were reduced significantly (Fig. 1c). In Fig. 1d the absolute numbers of B cells at B cell return are shown. The TTP patient relapsing at B cell return (indicated with the crossed symbol) had the highest absolute numbers of post-switch CD27⁺ and CD27⁻ memory B cells and also the highest value of sCD23 at B cell return (Table 1), but percentages of each B cell subpopulation were similar throughout.

In Fig. 2, B cell subpopulations in the remission group of TTP patients are shown in relation to time after RTX. The decrease in the percentage of naive (IgD⁺CD27⁻) B cells and the increase in percentages of CD27⁺ and CD27⁻ memory B cells were related significantly to time after treatment (Fig. 2a,c,d; *P* < 0.01 for all). There was no relationship between time after PEX/RTX and the rate of recovery of the pre-switch (IgD⁺CD27⁺) B cells, which was highly variable between individuals. (Fig. 2b). The resting memory population (IgD⁻CD27⁻) (Fig. 2d) appeared the most robust, with values approximating those of HC in most patients even at points close to B cell return.

BAFF-R expression (MFI) at B cell return

In Fig. 3a, BAFF-R expression in PBMC in an HC shows that only CD19⁺ cells express BAFF-R. After gating on the CD19⁺ population, the majority (>99%) of CD19⁺ cells express BAFF-R. Figure 3b shows a representative plot of BAFF-R expression on PBMC from a patient with TTP at B cell return, showing that BAFF-R expression was again restricted to CD19⁺ B cells but was greatly reduced.

Virtually all peripheral B cells from normal individuals express BAFF-R, as can be seen in Fig. 3c. At B cell repopulation in TTP patients, the percentage of B cells in each subpopulation expressing BAFF-R at B cell return was found to be significantly lower than HC in all subpopulations. The mean fluorescence intensity, which reflects the relative number of BAFF-R per cell, was also reduced markedly compared with HC, again across all B cell subpopulations (Fig. 3d).

BAFF-R on B cell subpopulations in patients in remission: relationship with serum BAFF

Although the percentages of BAFF-R⁺ B cells within all subpopulations were reduced compared with HC at B cell return, BAFF-R⁺ B cells increased to within the normal

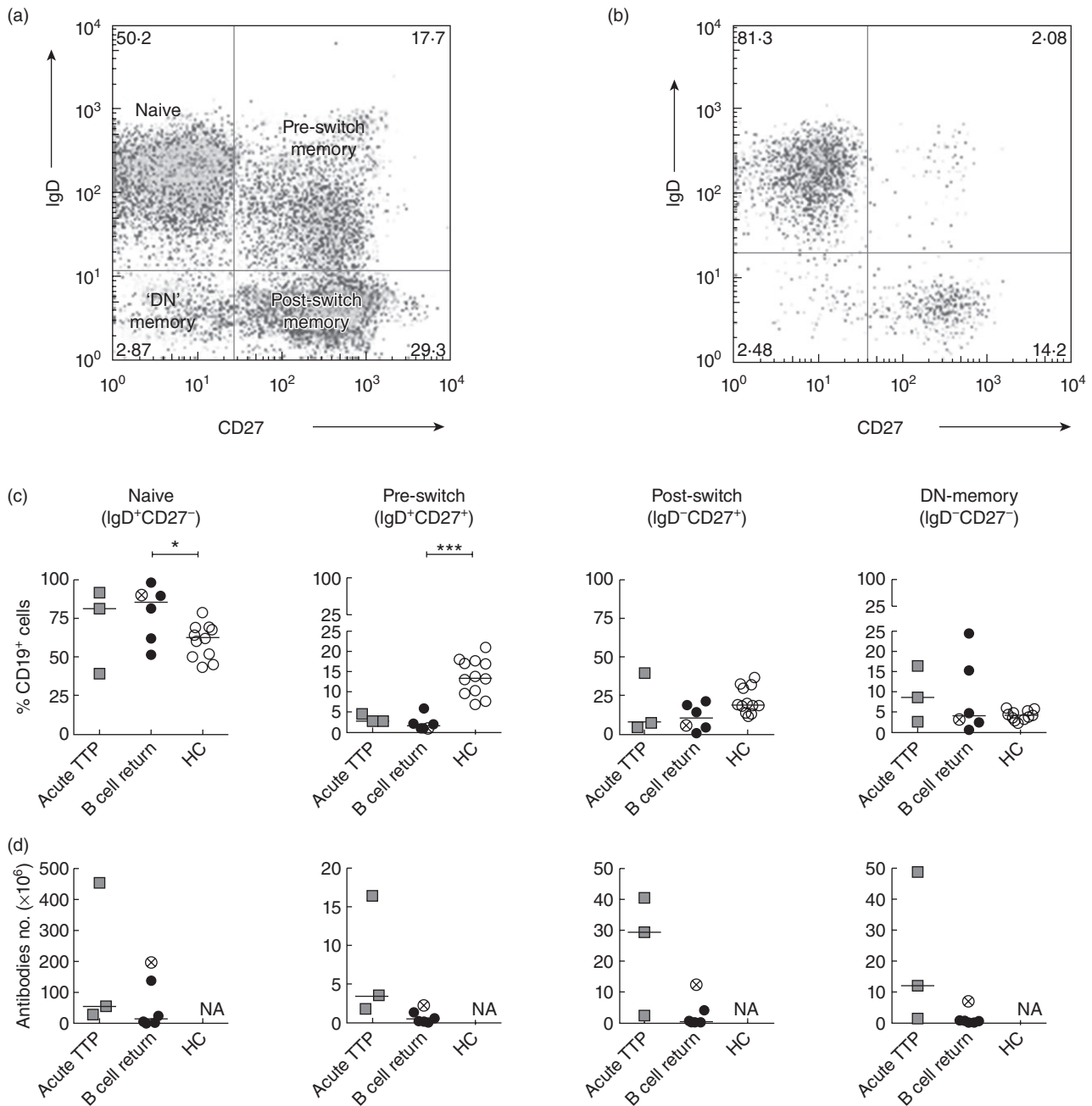


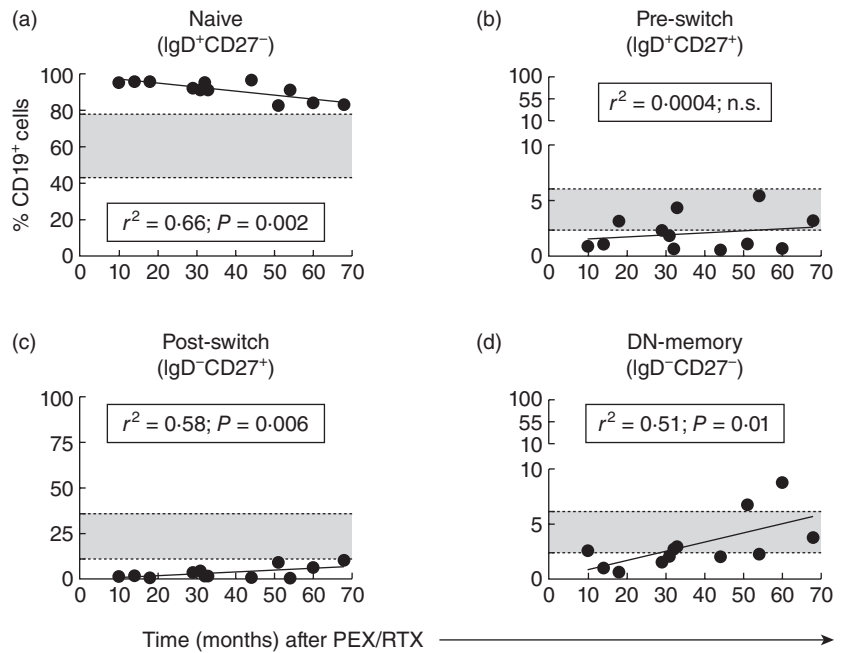
Fig. 1. Examples of immunochemical stainings for B cell subpopulations from a healthy control and from a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) at B cell return. Representative plots showing B cell subpopulations in CD19-gated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sample as defined using combinations of immunoglobulin (Ig)D and CD27 in a healthy control in (a) and (b) using PBMC taken from a patient with TTP at B cell return after rituximab (RTX). (c) Relative proportions of each B cell subpopulation (% total CD19⁺ cells) in each cohort of TTP patients at key points over the course of RTX are compared with healthy controls (HC). Comparisons were also made between median values in at key points, namely B cell return and remission. (d) Absolute numbers of B cells within each subpopulation are shown. Results were compared using Mann–Whitney rank sum analysis and significance levels indicated as * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

range in patients during remission following B cell return (Fig. 4a). However, despite a time-dependent increase in BAFF-R expression (MFI), most notably in naive and pre-switch B cells (Fig. 4b) the numbers of BAFF-R per cell remained well below the normal limits for healthy individuals for many months after PEX/RTX.

Relationships among serological parameters

It has been suggested that total available BAFF-binding receptors may regulate serum BAFF levels [30]. We therefore investigated whether there was a relationship between serum BAFF levels and BAFF-R expression (MFI) in

Fig. 2. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) patients in long-term remission: relationships between B cell subpopulations with time after rituximab (RTX). Percentages of each B cell subpopulation ($CD19^+$) in the 12 TTP patients in remission for >10 months following treatment are plotted against time in months after plasma-exchange (PEX)/RTX in (a–d). The solid line in each plot depicts the calculated linear regression with correlation statistics also given (Spearman's rank and correlation statistic) for each B cell phenotype. Shaded areas indicate the normal range of each B cell phenotype found in corresponding B cell subpopulations in healthy controls (HC). The decrease in the percentage of naive (IgD^+CD27^-) B cells and the decrease in percentages of $CD27^+$ and $CD27^-$ memory B cells with time after treatment were significantly related ($P > 0.01$ for all) but there was no relationship between time after PEX/RTX and recovery of the pre-switch B cell subpopulation.



repopulated TTP patients, and found a statistically significant inverse correlation over all B cell subpopulations (Fig. 4c) ($r^2 > 0.45$; $P < 0.01$ for all). BAFF levels in acute TTP patients and at B cell return were compared with HC and are shown in Fig. 5a. In the three acute TTP patients studied here BAFF levels were within normal limits, but may have been influenced by PEX/corticosteroids given before sampling. Following RTX, median BAFF levels remained significantly raised at B cell return compared to HC ($P < 0.05$), and most were above the normal upper-limit range (Table 1). Serum BAFF levels showed a significant negative correlation with time after treatment in the remission group, but most had fallen to levels within the normal range after less than 1 year in remission (Fig. 5b). In Fig. 5c, serum BAFF levels are plotted against numbers of $CD19^+$ B cells during remission; no correlation was found, but notably most patients' B cell counts had shown a robust recovery after PEX/RTX to well within the normal range.

ADAMTS13 levels showed a weak but significant negative correlation with both absolute numbers of memory B cells and serum total IgG levels (Spearman's rank correlation; $r^2 > 0.36$; $P < 0.05$) (data not shown). Although sCD23 levels remained at the lower end of the normal range they were associated strongly with absolute numbers of IgD^+CD27^+ and IgD^-CD27^+ pre- and post-switched memory B cells in patients in remission (Spearman's rank correlation; $r^2 = 0.57$ and 0.53 , respectively, $P < 0.01$ for both). There was also a significant negative correlation between soluble CD23 levels with the percentage of naive B cells (IgD^+CD27^-) and a positive correlation with the percentage of post-switch memory B cells (both $r^2 > 0.52$; $P < 0.01$) (Supporting information, data 1).

Discussion

In patients with TTP, therapy based on RTX has established that autoreactive B cells play key roles in disease pathogenesis [7,11]. One of the first observations with respect to B cell kinetics after B cell-depleting therapy in autoimmune diseases was that relapse occurred at the time of or after B cell return, and that B cell return mirrored ontogeny [31,32]. The relative number of returning B cells, however, has not been a reliable indicator of the likelihood of return of symptoms either in patients with RA or in TTP [26,33]. Analysis of B cell phenotype and serological studies following RTX-based therapy in patients with autoimmune rheumatic diseases has shown that the most consistent indicator of disease resumption is rapid progress towards differentiation into $CD27^+$ memory B cells and immunoglobulin secretion [31,32,34]. As ADAMTS13 autoantibodies are associated strongly with both the presence and activity of disease, it is likely that the same applies to patients with TTP.

B cells re-expand into an otherwise mainly intact immune environment of antigen processing and presenting cells and memory T cells after RTX. Resumption of pathogenic autoantibody production and subsequent relapse may be triggered by clonal expansion of autoreactive B cells either following selection from new naive B cells or from residual memory populations. The qualitative element for selection would thus be in the specificity of particular B cell receptors (BCR) on autoreactive B cells. Differentiation to autoantibody production would necessarily also imply that the parent B cells had successfully escaped tolerogenic checkpoints and were able to recruit appropriate T cell help.

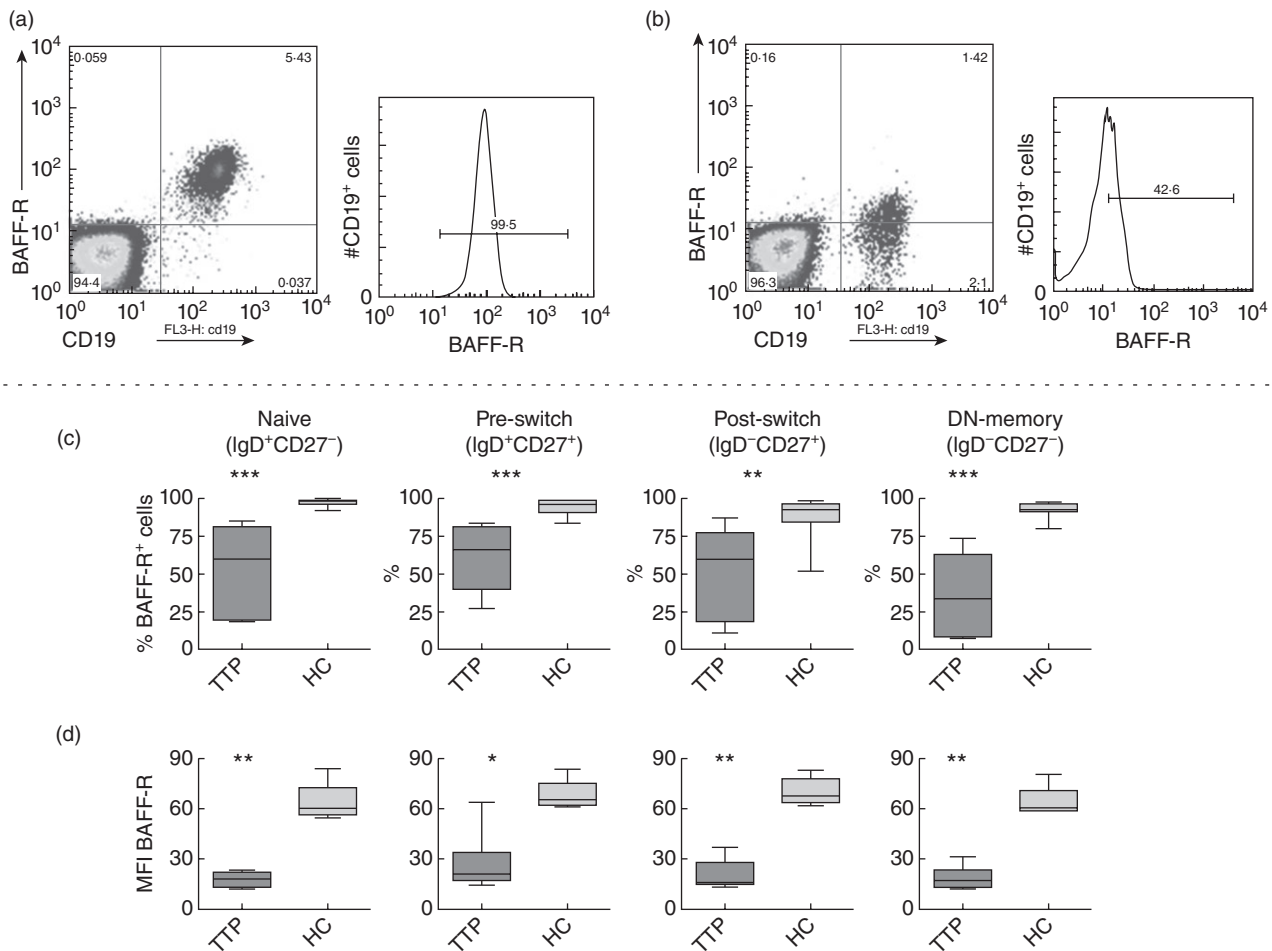


Fig. 3. CD19⁺ B cells in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) patients at B cell return after rituximab (RTX). The representative plot in (a) shows B cell activating factor (BAFF)-R expression on CD19⁺ B cells from a healthy control within the lymphocyte gate and also the derived histogram showing relative expression of BAFF-R within the gated CD19⁺ population. (b) The %CD19⁺ B cells positive for BAFF-R are shown for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) taken close to B cell return from TTP patients. In (c), % CD19⁺ cells positive for BAFF-R and (d), mean fluorescence intensity (MFI) of BAFF-R expression, are compared at B cell return with values for B cell subpopulations from healthy controls (HC). Box-and-whiskers indicate median, 25th, 75th percentiles and ranges in all four B cell subpopulations, as defined by CD19/IgD/CD27. Significance levels comparing HC with TTP patient groups at B cell return were determined using the Mann-Whitney rank sum test (***for $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

In this cross-sectional study, we found that following the return of predominantly naive B cells to the periphery after RTX, the levels of pre- and post-switched memory B cells in TTP patients remained significantly lower than in healthy controls and resembled a developmental stage analogous to that in young children [35]. During the months following B cell return, there was a gradual rise in memory compartments, but even in patients with up to 5.5 years of follow-up, all B cell subpopulations failed to reach levels seen in (adult) HC, despite the CD19 count being well within the normal range (Fig. 2; Table 1 and Fig. 5c). The finding that sCD23 levels remained towards the lower end of the normal range supported the phenotype studies, but was linked with both percentage and absolute numbers of CD27⁺ B cells *in vivo*, may prove a useful predictive marker of reconstitution

of the memory B cell compartment. Without further markers, it was not possible to discern whether the poorly recovering pre-switch memory B cell subpopulation was representative of splenic marginal zone (IgM⁺IgD⁺CD27⁺) or IgM⁺IgD⁺CD27⁺ memory B cells [36–38]. Poor memory B cell reconstitution may reflect long-term indirect effects of RTX on B cells, described both after organ transplantation [39] and in other autoimmune diseases [32,40]. The reasons are not understood fully, but it has been suggested that productive germinal centre reactions may be disturbed due to microenvironmental changes caused by the absence of, or reduction in, mature B cells [40–42].

Our results also suggested that slow memory B cell reconstitution in TTP patients was linked with extended periods of remission. As relapse is associated most strongly

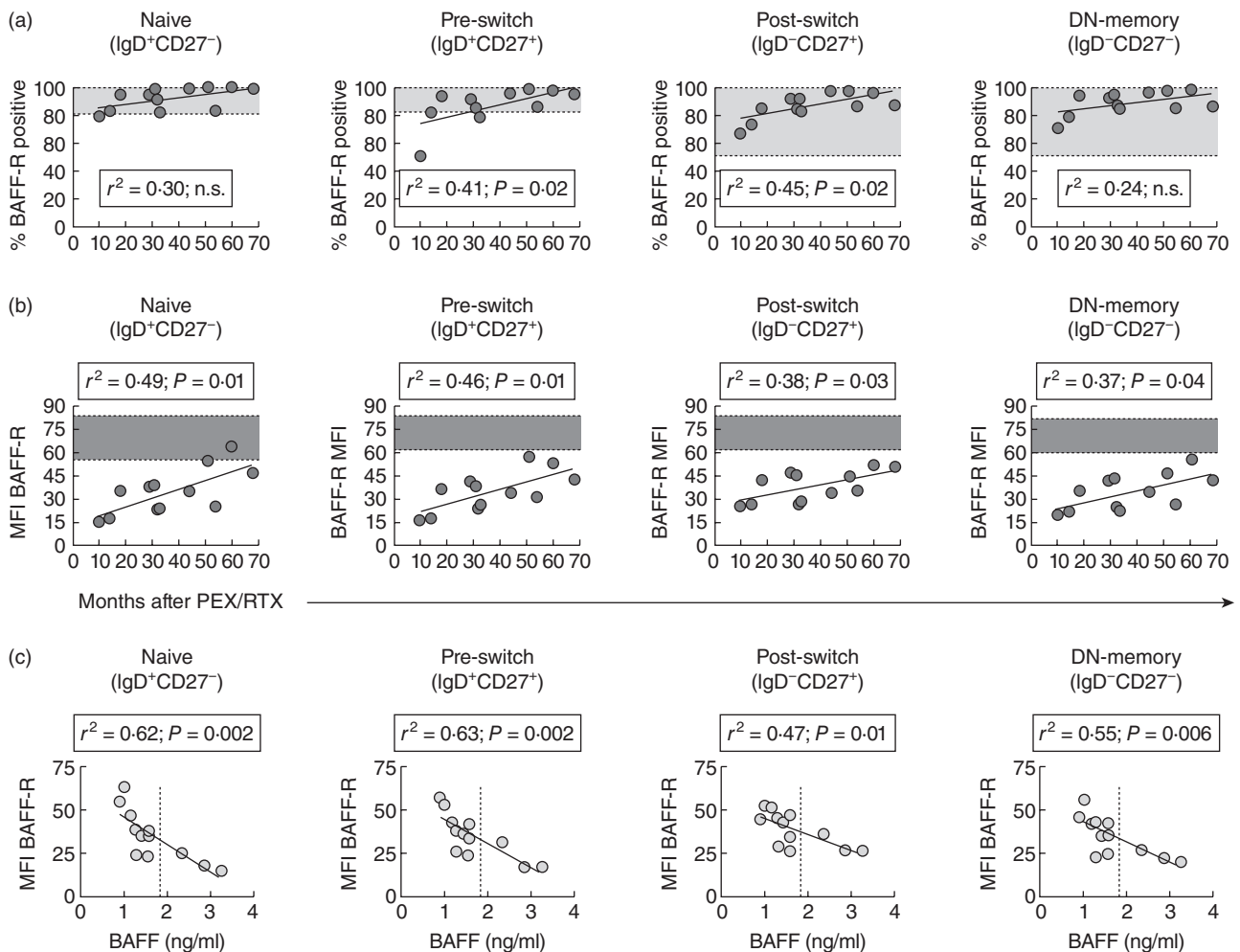


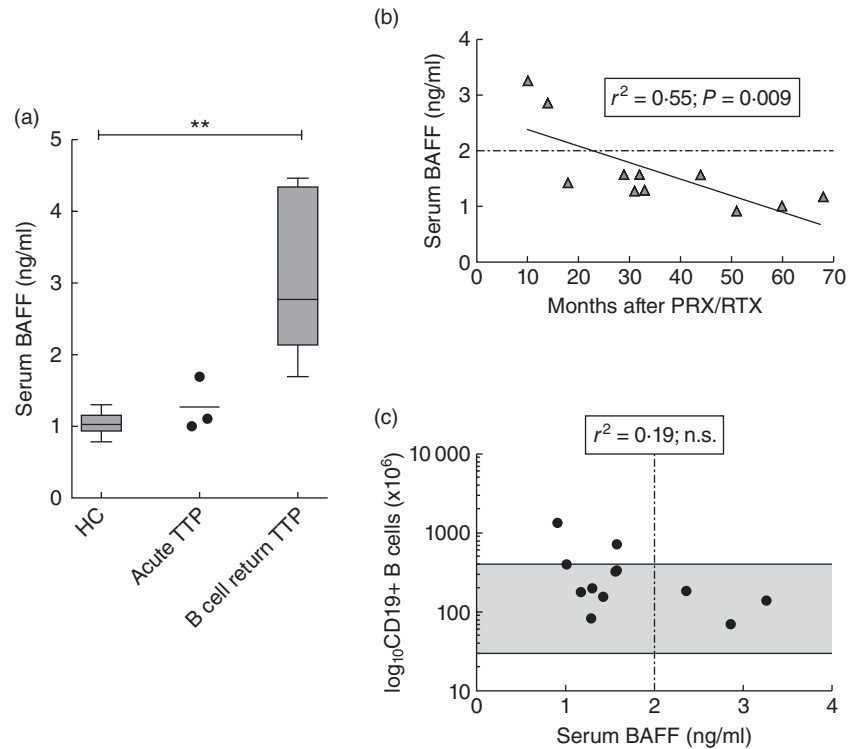
Fig. 4. Changes in percentages positive and relative expression [mean fluorescence intensity (MFI)] of B cell activating factor (BAFF)-R on B cell subpopulations with time after rituximab (RTX). The panel in (a) shows the percentages of CD19⁺ B cells positive for BAFF-R in B cell subpopulations defined by immunoglobulin (Ig)D/CD27 for TTP patients in long-term remission after plasma-exchange (PEX)/RTX in relation to time after treatment. Similarly, in (b) the mean fluorescence intensity (MFI) of BAFF-R expression on CD19⁺ B cells in each subpopulation are shown. The normal ranges of values given by respective B cell subpopulations in healthy controls (HC) are indicated by shaded areas in both (a) and (b). In (b) the MFI of BAFF-R expression in all four B cell subpopulations were plotted against serum BAFF levels. The solid lines in all graphs depict the calculated linear regression and correlation statistics (Spearman's rank test). Vertical lines in (c) indicate upper limit of normal range for serum BAFF.

with return or rises in autoantibodies to ADAMTS13, the selection and differentiation of specifically autoreactive B cell clones from naive and/or memory B cell populations must also play a key role. If derived from newly generated naive B cells, the production of anti-ADAMTS13 may additionally involve a change in affinity through clonal expansion and somatic hypermutation. The chances of sufficient autoreactive clones being selected, expanded and differentiating into immunoglobulin secreting cells may thus be low after RTX in TTP patients. The relative frequencies of autoreactive (ADAMTS13) B cell clones and the availability of specific T cells may therefore affect the relative lengths of remission in TTP, which may be distinct from those in other autoimmune diseases following RTX. For example,

autoreactive B cell clones in patients with RA may be expanded more easily due to the potentially promiscuous nature of B cells with specificity for Fc of IgG or citrullinated proteins [28,43,44]. Information regarding the precursor frequency and activation requirements of naive or of memory B cells specific for ADAMTS13 are lacking in TTP patients.

In normal individuals, BAFF-R is expressed on the majority (>98%) of circulating B cells, and binds only BAFF [45]. We found here that BAFF-R expression [both the percentage B cells and relative expression (MFI)] was reduced significantly at B cell return, as we have also found previously in patients with RA [46]. Despite that the percentage of B cells across all subpopulations had regained levels

Fig. 5. Serum B cell activating factor (BAFF) levels and relationships with B cell return, time after rituximab (RTX) and B cell numbers during remission. In (a) serum BAFF levels in healthy controls (HC) and in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) patients at acute presentation and at B cell return are shown. Box indicates median, 25th and 75th percentiles and the whiskers indicate ranges of values for each group. Comparisons were made using the Mann–Whitney *U*-test with significance levels indicated (** $P < 0.001$). In (b) and (c), respectively, the relationship between serum BAFF levels with time after plasma-exchange (PEX)/RTX and with number of CD19⁺ B cells, respectively, in patients remaining in long-term remission are shown. The solid lines indicate the calculated linear regression and correlation statistic (Spearman's rank) in each graph. Dashed lines show upper limit of normal range for serum BAFF. Dotted line in (b) indicates cut-off level for B cell return (>5 CD19⁺ cells/ μ).



within the normal range during remission, the expression (MFI) of BAFF-R was reduced markedly for many months after therapy across all B cell subpopulations. This is similar to findings in ontogeny, where naive (often CD5⁺) B cells express less BAFF-R compared with adult B cells [47]. In patients with BAFF-R deficiency, who form a subset of patients with late-onset common variable immunodeficiency (CVID), there are severely reduced numbers of all mature B cell subsets [17], reflecting the need for naive B cells to signal through BAFF/BAFF-R for survival [48]. A partial reduction in BAFF-R expression on naive B cells after RTX may therefore decrease the level of expression of anti-apoptotic markers maintained through this receptor, thus reducing the proportion of cells able to mature further.

Serum BAFF levels were raised in most patients at B cell return and decreased with time after treatment during remission. Our analyses showed that, after BCDT, there was a strong negative association with the concentration of serum BAFF with BAFF-R (MFI) expression. Levels of BAFF above those present in normal serum have been shown previously to modulate BAFF-R expression in the absence of productive NF- κ B signalling *in vitro* [49]. In our studies, we found that even modest levels of serum BAFF, within normal limits, appeared to be significantly inversely associated with BAFF-R expression, but not with the number of CD19⁺ B cells *per se*, in patients with TTP during remission.

The presentation of ADAMTS13 protein to T cells is thought to be via binding to an endogenous ligand

(mannose receptor) on dendritic cells [50]. Internalization and presentation of peptides to CD4⁺ T cells will then rely primarily upon microenvironmental factors, such as the supply of autoantigen (ADAMTS13). The local production of cytokines (perhaps induced by complexed autoantigen) will then impact the maturation state of the dendritic cells and the processing and presentation of antigenic moieties. A strong link between the development of idiopathic TTP with human leucocyte antigen (HLA)-DRB1*11 may also favour the presentation of specific peptides to appropriate CD4⁺ T cells [51,52]. The selection of autoreactive B cells specific for conformational epitopes on the native protein will therefore depend upon the selection and affinity maturation of B cells with appropriate B cell receptors (BCR) and prosurvival signals delivered through receptors for BAFF. The autoantibodies to ADAMTS13 in TTP patients are class-switched and somatically mutated [4] and thus have the signature of probably being generated in a T cell-dependent reaction. The answer as to why the regeneration of a pathogenic autoimmune response to ADAMTS13 is so delayed after RTX may reflect the stoichiometry of the selection of 'new' clones of B cells with appropriate BCR, BAFF-binding and signalling and the availability of help from (presumably) long-lived T cells. We describe here another possibly contributory mechanism for the delay in disease return. It appears that as a consequence of RTX removing a large proportion of the mature B cell pool, the naive B cells generated thereafter show a marked down-regulation of BAFF-R expression, related inversely to serum BAFF levels.

In conclusion, the continuation of disturbances of B cell homeostasis after RTX in TTP patients may be due initially to the reduction in the 'bulk' of B cells by RTX and the resultant raised serum BAFF levels. Expansion of repopulating naive B cells with low numbers of BAFF-R/per cell into such a BAFF-rich environment seems, conversely, to have a negative effect on BAFF-R expression, as shown here. Although BAFF-R expression gradually increased with time after RTX, it failed to reach levels comparable with HC, even after more than 5 years in some patients. The process of B cell repopulation after RTX in patients with TTP follows a similar pattern to ontogeny. The fact that naive B cells (IgD⁺CD27⁻) predominate for such long periods after RTX, together with down-regulation of receptors for BAFF, may therefore contribute indirectly to the delay in disease reactivation in patients with TTP. Reduced capacity to generate memory B cells may result as a consequence of the disruption of germinal centre architecture following RTX, as described in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [40], or due possibly to a higher threshold for B cell survival. Signalling through both BAFF-R and the B cell receptor are important separately and simultaneously for mature naive B cell survival, sharing anti-apoptotic signalling through NF- κ B; therefore a reduction in expression of BAFF-R may affect this prosurvival pathway [53]. This may therefore affect the resumption of autoimmunity by slowing the rate of selection and expansion of B cell clones, perhaps even those with appropriate ADAMTS13 specificity. Relative proportions of different B cell subpopulations and BAFF-R expression following RTX may therefore provide a cellular monitor for factors associated with prolonging remission in patients with TTP. The use of sCD23 as a biomarker of B cell differentiation to CD27⁺ status may also provide a useful correlate of B cell maturation following B cell-depleting therapies.

Acknowledgements

E. B. and I. d. I. T. were supported by a grant from the Alfonso Martin Escudero Foundation, Madrid, Spain.

Disclosure

E. B., E. O. H., M. A. S., I. d. I. T., J.-P. W. and G. C. have no conflicts of interest to declare.

M. L. has received consultancy and speaker fees from Roche, Chugai, BMS and Lilly, sponsorship to attend medical meetings by Roche and Chugai and research funding from Roche and GSK.

Author contributions

E. B. performed the B cell phenotype studies and performed the analyses of FACS data with M. J. L.; M. A. S. collected and collated clinical and laboratory data on the TTP

patients with J.-P. W.; E. O. H. collected and stored clinical samples from patients. G. C. and M. J. L. designed the experiments and G. C. performed BAFF and sCD23 ELISAs. All authors contributed to and approved the final manuscript.

References

- 1 Scully M, Hunt BJ, Benjamin S *et al.* for the British Committee for Standards in H. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* 2012; **158**:323–35.
- 2 Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; **89**:3097–103.
- 3 Furlan M, Robles R, Galbusera M *et al.* von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; **339**:1578–84.
- 4 Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheiflinger F. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2009; **7**:1703–10.
- 5 McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010; **8**:1201–8.
- 6 Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK *et al.* Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; **84**:2457–66.
- 7 Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; **350**:2572–81.
- 8 Jones RB, Tervaert JW, Hauser T *et al.* Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010; **363**:211–20.
- 9 Heidele F, Lipka DB, von Auer C, Huber C, Scharrer I, Hess G. Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. *Thromb Haemost* 2007; **97**:228–33.
- 10 Scully M, Cohen H, Cavenagh J *et al.* Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol* 2007; **136**:451–61.
- 11 Scully M, McDonald V, Cavenagh J *et al.* A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2011; **118**:1746–53.
- 12 Froissart A, Buffet M, Veyradier A *et al.* Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med* 2012; **40**:104–11.
- 13 Westwood JP, Webster H, McGuckin S, McDonald V, Machin SJ, Scully M. Rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura: benefit of early administration during acute episodes and use of

- prophylaxis to prevent relapse. *J Thromb Haemost* 2013; **11**:481–90.
- 14 Hie M, Gay J, Galicier L *et al*. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2014; **124**:204–10.
 - 15 Cancro MP. The BLyS/BAFF family of ligands and receptors: key targets in the therapy and understanding of autoimmunity. *Ann Rheum Dis* 2006; **65** (Suppl. 3):iii34–36.
 - 16 Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity* 2007; **26**:205–13.
 - 17 Warnatz K, Salzer U, Rizzi M *et al*. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:13945–50.
 - 18 Thomas MR, Machin SJ, Mackie I, Scully MA. B cell activating factor is elevated in acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2011; **155**:620–2.
 - 19 Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:723–32.
 - 20 Seror R, Sordet C, Guillevin L *et al*. Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**:351–7.
 - 21 Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC *et al*. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**:1011–6.
 - 22 Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; **188**:1679–89.
 - 23 Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* 2011; **2**:81.
 - 24 Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 2001; **167**:3610–8.
 - 25 Weller S, Braun MC, Tan BK *et al*. Human blood IgM 'memory' B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004; **104**:3647–54.
 - 26 Scully M. Rituximab in the treatment of TTP. *Hematology* 2012; **17** (Suppl. 1):S22–24.
 - 27 Bansal AS, Haeney MR, Cochrane S *et al*. Serum soluble CD23 in patients with hypogammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1994; **97**:239–41.
 - 28 Cambridge G, Perry HC, Nogueira L *et al*. The effect of B-cell depletion therapy on serological evidence of B-cell and plasma-blast activation in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *J Autoimmun* 2013; **50**:67–76.
 - 29 Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETSS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005; **129**:93–100.
 - 30 Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U *et al*. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol* 2012; **188**:497–503.
 - 31 Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:2377–86.
 - 32 Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JCW. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:613–20.
 - 33 Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JCW. Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 years. *Rheumatology* 2007; **46**:626–30.
 - 34 Vital EM, Dass S, Buch MH *et al*. B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011; **63**:3038–47.
 - 35 Bhat NM, Kantor AB, Bieber MM, Stall AM, Herzenberg LA, Teng NN. The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int Immunol* 1992; **4**:243–52.
 - 36 Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V *et al*. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011; **118**:2150–8.
 - 37 Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:267–85.
 - 38 Roll P, Dorner T, Tony HP. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:1566–75.
 - 39 Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C *et al*. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27⁺ B cells. *Exp Hematol* 2005; **33**:480–6.
 - 40 Anolik JH, Barnard J, Owen T *et al*. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 2007; **56**:3044–56.
 - 41 Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B *et al*. B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol* 2007; **122**:139–45.
 - 42 Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; **22**:538–40.
 - 43 Roosnek E, Lanzavecchia A. Efficient and selective presentation of antigen–antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 1991; **173**:487–9.
 - 44 Ireland JM, Unanue ER. Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system. *Autophagy* 2012; **8**:429–30.
 - 45 Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 2005; **36**:1113–9.
 - 46 de la Torre I, Moura RA, Leandro MJ, Edwards J, Cambridge G. B-cell-activating factor receptor expression on naive and memory B cells: relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following B-cell depletion therapy. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**:2181–8.

- 47 Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 2007; **110**:2948–54.
- 48 Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:491–502.
- 49 Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; **179**:7276–86.
- 50 Sorvillo N, Pos W, van den Berg LM *et al.* The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. *Blood* 2012; **119**:3828–35.
- 51 Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost* 2010; **8**:257–62.
- 52 Coppo P, Busson M, Veyradier A *et al.* HLA-DRB1*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost* 2010; **8**:856–9.
- 53 Woo YJ, Yoon BY, Jhun JY *et al.* Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF-KappaB signaling in rheumatoid arthritis B cells. *Exp Mol Med* 2011; **43**:350–7.

Supporting information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Supplementary Data 1. Correlation between decrease in naive B cells and increase in post-switch memory B cells (gated on CD19⁺ population) with serum levels of sCD23 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in long-term remission [10–68 months after plasma-exchange/rituximab (PEX/RTX)]. Normal range for sCD23 is from 1235–5024 pg/ml.

Long-term safety of rituximab in patients with rheumatoid arthritis

Aim: To evaluate the long-term safety of rituximab in our cohort of 173 patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab and followed-up for longer than 1 year. **Materials & Methods:** Retrospective study of adverse events, including infusion reactions, neutropenia, hypogammaglobulinemia, infections, malignancies and development of autoimmune conditions. **Results:** Safety analysis is based on 768.4 patient-years of observation. Four patients had an episode of early-onset neutropenia; nine patients had late-onset neutropenia, although only two were severe; 27% of the patients in the cohort have experienced respiratory infections; 25% have had low IgM determinations; and 24% have had low IgG determinations. **Conclusion:** Long-term follow-up of rheumatoid arthritis patients on rituximab therapy has shown efficacy and safety profiles similar to clinical trials. The incidence of hypogammaglobulinemia increased after multiple cycles and could contribute to repeated infections and be a limiting factor for future cycles of treatment, although most patients remained stable despite low immunoglobulin levels.

KEYWORDS: B-cell depletion ■ immunoglobulins ■ infections ■ malignancies ■ neutropenia ■ rheumatoid arthritis ■ rituximab ■ safety

Elena Becerra^{1,2},
Geraldine Cambridge¹,
Inmaculada
de la Torre^{1,2}
& Maria J Leandro^{*1}

¹Centre for Rheumatology Research,
University College London, 250 Euston
Road, London, NW1 2PQ, UK

²Department of Rheumatology,
Gregorio Marañón Hospital,
Madrid, Spain

*Author for correspondence:
Tel.: +44 2034479215
Fax: +44 2034479278
maria.leandro@ucl.ac.uk

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease with articular and extra-articular involvement. The role of B cells in the pathogenesis of the disease, in particular possible roles as antigen-presenting cells and as the precursors of the autoantibody-producing cells (plasma cells), has regained importance over the last few years following the success of B-cell depletion therapy.

Rituximab (RTX) is a chimeric monoclonal anti-CD20 antibody, which was licensed for CD20⁺ B-cell non-Hodgkin's lymphoma in 1997 [1,2]. It was first used for RA in an open study of five patients starting in 1998 [3]. The first randomized, double-blind, controlled study confirming its efficacy and safety was published in 2004 [4]. Subsequent clinical trials (REFLEX [5] and DANCER [6]) were published in 2006, both confirming the efficacy and safety profiles shown previously.

The CD20 antigen is expressed by all cells of B-cell lineage except for the earlier precursors (stem cells and pro-B cells) and the terminally differentiated plasma cells. RTX is thought to deplete B cells mainly by antibody-dependent cell- and complement-mediated cytotoxicity. Direct binding also results in apoptosis *in vitro*, but it is not known how important apoptosis is *in vivo*, particularly in the depletion of normal B cells. One course of standard dose RTX leads to major B-cell depletion. However, the degree of depletion in the peripheral blood and

in the synovium varies between individuals and it is likely that this is also true for depletion in other tissues. RTX has a prolonged half-life, and in many patients free RTX can still be detected in the serum 3 months after one course of treatment. Repopulation of the peripheral blood usually starts 6–9 months after treatment [2], but the speed of recovery of B-cell numbers varies between patients. In some patients, normal numbers can be seen at the time when repopulation is first detected, while in others B-cell numbers can remain below the normal range for several months or even years. Repopulation following depletion with RTX recapitulates B-cell ontogeny to a certain extent, similar to what is seen after bone marrow transplantation. Repopulation is initially mainly with naive B cells, many with an immature phenotype, and recovery of memory subsets lags behind [7,8]. Time to repopulation following treatment probably depends on the clearance of the drug and the individual bone marrow regenerative capacity. Although immunoglobulin levels usually remain within the normal range after one course of treatment with RTX, repeated treatment courses (as needed for sustained disease control) can result in hypogammaglobulinemia [9]. This most often involves IgM and less frequently IgG. IgA is not usually affected.

Published reports from randomized clinical trials usually include safety results for only

Original article

Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics

Inmaculada De La Torre^{1,2}, Maria J. Leandro¹, Lara Valor^{1,2}, Elena Becerra^{1,2}, Jonathan C. W. Edwards¹ and Geraldine Cambridge¹

Abstract

Objective. To investigate whether the incidence of secondary hypogammaglobulinaemia in patients with RA following rituximab was related to patterns of B-cell return and relapse.

Methods. CD19⁺ B-cell and serum immunoglobulin (slg) determinations were done every 2 or 3 months in 137 consecutive patients treated with one or more courses of rituximab-based B-cell depletion therapy. The pattern of B-cell return, either concordant or discordant with relapse, was also recorded.

Results. There were 119 responders. Before treatment, three patients had low IgM and four had low IgG. After the first cycle, low IgM or IgG was present in 9.2% (11/119) and 11.8% (14/119) of the patients, respectively, increasing to 38.8% (8/18) and 22.2% (4/18) after five cycles. The mean percent maximum slg decrease/cycle was relatively constant. The CD19⁺ B-cell count at repopulation was not correlated with immunoglobulin (Ig) levels after each cycle. Patients discordant for B-cell return and relapse developed significantly lower serum IgM and more low IgM episodes than concordant patients ($P < 0.05$).

Conclusion. Patients with lower baseline slg levels tended to develop persistent IgM and IgG hypogammaglobulinaemia, resulting from an accumulation of incremental decreases after repeat cycles. This was not due to lower numbers of returning B cells in those developing low slgs. The association of low IgM in patients with a discordant pattern of relapse suggests that underlying defects in B cells relating to survival and maturation into Ig-secreting cells, as well as attrition of IgG plasma cells may be contributing to low slg levels in some patients.

Key words: rheumatoid arthritis, rituximab, immunoglobulins, CD19⁺ B cells, B-cell depletion.

Introduction

In patients with RA, the rationale of B-cell depletion therapy (BCDT) based on rituximab was to eliminate autoreactive B-cell clones, as precursors of autoantibody secreting cells, while minimizing the period of impact on normal B cells and production of protective antibodies [1]. When adequate levels of depletion are attained in the circulation, clinical benefit can last for months, or in some cases years [2, 3]. Approximately half of the patients

relapse at B-cell return or within 3 months (concordant relapse), while in others clinical relapse can be delayed for up to a further 2.5 years after B-cell return (discordant relapse) [4]. In both situations, further BCDT cycles or other treatments are needed to restore clinical response. The long gap between repopulation and relapse in some patients suggests that re-engagement of pathogenic pathways may rely on the accumulation or expansion of pathogenic effector cells or is actively suppressed.

The initial theoretical basis for using B-cell depletion in patients with RA was to eliminate autoreactive B cells, and therefore their autoantibody-producing daughter plasma cells. Autoantibody containing pathogenic immune complexes and the cycle of B-cell self-perpetuation would thus be reduced as a consequence [1]. However, others have concluded that the therapeutic success of rituximab was the result of removing B cells more directly involved in synovitis through, among other mechanisms, production

¹Division of Rheumatology, Department of Medicine, University College of London, London, UK and ²Rheumatology Division, Hospital Gregorio Marañon, Madrid, Spain.

Submitted 2 March 2011; revised version accepted 7 November 2011.

Correspondence to: Geraldine Cambridge, Division of Rheumatology, Department of Medicine, University College London, Rayne Institute, 5 University Street, London WC1E 6JF, UK.
E-mail: g.cambridge@ucl.ac.uk

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Best Practice & Research Clinical Rheumatology

journal homepage: www.elsevierhealth.com/berh

7

B-cell therapies in established rheumatoid arthritis

Maria J. Leandro, MD, PhD, Consultant Rheumatologist, Honorary Senior Lecturer^{a,*}, Elena Becerra-Fernandez, MD^{a,b}

^a Centre for Rheumatology Research, Department of Medicine, University College London, London, UK

^b Department of Rheumatology, Gregorio Marañon Hospital, Madrid, Spain

Keywords:

Rheumatoid arthritis
Rituximab
B cells
B cell depletion
B cell therapies

B-cell depletion therapy based on rituximab is effective and relatively safe in established rheumatoid arthritis. Rituximab is licensed for the treatment of rheumatoid arthritis in combination with methotrexate and in patients who did not respond or cannot tolerate tumour necrosis factor antagonists. Sustained control of disease activity can be achieved by repeated courses of treatment. The optimal dose and schedule of retreatment are still not established. Nevertheless, data are now available that provide a good base for current clinical practice and a good starting point for further research. In general, rituximab has a good safety profile with most studies showing similar incidences of serious adverse events and infections to placebo. However, reasonable and well-funded doubts remain over the safety of long-term strategies of treatment of rheumatoid arthritis with rituximab, in particular, in relation to the risk of secondary hypogammaglobulinaemia and potential increased risk of infections.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Specific targeting of B cells in the treatment of established rheumatoid arthritis (RA) was first used at UCL in 1998 with a B-cell depletion protocol based on rituximab [1]. Following the initial open-label trials, B-cell depletion therapy based on rituximab was proved to be an effective and relatively safe treatment for patients with RA in randomised, placebo-controlled trials [2–4]. In many patients with RA, disease manifestations can be controlled by repeated courses of rituximab [5–7]. Rituximab was licensed for the treatment of refractory RA in 2006.

* Corresponding author. UCLH, Rheumatology, 3rd Floor Central, 250 Euston Road, London NW1 2PQ, UK. Tel.: +44 (0) 2034479215; fax: +44 (0) 2034479278.

E-mail address: maria.leandro@ucl.ac.uk (M.J. Leandro).

